

ROBERTA FERREIRA LEITE

**Análise lipidômica, metabolômica e dos atributos  
espermáticos de touros com diferentes taxas de fertilidade  
e perfis de congelação de sêmen**

São Paulo

2022

ROBERTA FERREIRA LEITE

**Análise lipidômica, metabolômica e dos atributos espermáticos de touros com diferentes taxas de fertilidade e perfis de congelação de sêmen**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutora em Ciências

**Departamento:**

Reprodução Animal

**Área de concentração:**

Reprodução Animal

**Orientador:**

Prof. Dr. Marcilio Nichi

São Paulo

2022

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

## DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4171  
FMVZ

Leite, Roberta Ferreira  
Análise lipídômica, metabolômica e dos atributos espermáticos de touros com diferentes taxas de fertilidade e perfis de congelamento de sêmen / Roberta Ferreira Leite. – 2022.  
383 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2022.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcilio Nichi.

1. Espermatozoides. 2. Subfertilidade. 3. Criopreservação. 4. Perfil funcional.  
5. Perfil metabólico. I. Título.



## Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Universidade de São Paulo

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Análise lipidômica, metabolômica e dos atributos espermáticos de touros com diferentes taxas de fertilidade e perfis de congelamento de sêmen", protocolada sob o CEUA nº 2054100717 (ID 004381), sob a responsabilidade de **Marcílio Nichi e equipe; Roberta Ferreira Leite** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 13/12/2017.

We certify that the proposal "Lipidomics, metabolomics and sperm attributes of bulls with different fertility rates and cryopreservation profiles", utilizing 40 Bovines (40 males), protocol number CEUA 2054100717 (ID 004381), under the responsibility of **Marcílio Nichi and team; Roberta Ferreira Leite** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 12/13/2017.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [10/2017](#) a [06/2021](#) Área: [Reprodução Animal](#)

Origem: [Animais provenientes de estabelecimentos comerciais](#)

Espécie: [Bovinos](#) sexo: [Machos](#) idade: [2 a 10 anos](#) N: [40](#)

Linhagem: [variadas de taurinos e zebuinos](#) Peso: [600 a 800 kg](#)

Local do experimento: Parte do experimento para a preparação das amostras de sêmen fresco será feita no laboratório da central de coleta de sêmen para posterior análise no Laboratório de Andrologia da FMVZ-USP. As amostras de sêmen congelado serão analisadas no Laboratório de Andrologia da FMVZ-USP.

São Paulo, 17 de janeiro de 2022

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

Camilla Mota Mendes  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo



## Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Universidade de São Paulo

São Paulo, 09 de novembro de 2021

CEUA N 2054100717

(ID 008445)

Ilmo(a). Sr(a).  
Responsável: Marcílio Nichi  
Área: Reprodução Animal

Título da proposta: "Análise lipídômica, metabolômica e dos atributos espermáticos de touros com diferentes taxas de fertilidade e perfis de congelamento de sêmen".

### **CERTIFICADO (Emenda versão de 28/setembro/2021)**

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 28/setembro/2021) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Devido a pandemia de COVID-19, o prazo do projeto foi prorrogado para 26/05/2022.".

Nova previsão de término da proposta: **05/2022**

Comentário da CEUA: Nova previsão de término: 05/2022

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

Camilla Mota Mendes  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: LEITE, Roberta Ferreira

Título: **Análise lipidômica, metabólica e dos atributos espermáticos de touros com diferentes taxas de fertilidade e perfis de congelação de sêmen**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família. Ao meu avô que dividiu comigo o seu amor pelos estudos, não apenas da veterinária, mas de tudo que despertasse minha curiosidade. Ao meu pai que, com muito amor, me ensinou a seguir sonhos e alcançar realizações. À minha mãe e ao Reche, que sempre me apoiaram, especialmente nessa nova jornada, com amor e força constantes.

Dedico também aos meus mestres, que por ensinamentos e exemplos estão ao meu lado desde o início da minha caminhada, e aos amigos queridos que participaram e me ajudaram muito nessa nova trajetória da minha vida.

*“Still round the corner there may wait  
A new road or a secret gate  
And though I often have passed them by  
A day will come at last when I  
Shall take the hidden paths that run  
West of the Moon, East of the Sun.”*

A Walking Song - The Lord of the Rings (1954)

J.R.R. Tolkien

## AGRADECIMENTOS

Muito a agradecer por esses últimos anos, principalmente por ter voltado ao lugar que me proporcionou anos maravilhosos na vida, a FMVZ-USP. Volta que permitiu, mais uma vez, que eu ganhasse não apenas conhecimento, mas experiências, convivências e amizades, com grande crescimento pessoal.

Essa nova caminhada, não seria possível sem o apoio constante do meu grande amor. Obrigada Reche por ter sido sempre o melhor companheiro, ter aguentado os momentos de estresse, comemorado as conquistas, lido e corrigido textos e, além de tudo, por ter me alimentado, com o grande estilo do “Chef Medrano”, nos meses em que eu fiquei analisando dados, escrevendo e estudando. Gratidão infinita à minha mãe, por estar sempre ao meu lado, me apoiando com amor, pela preocupação e por me lembrar sempre de ter paciência e esperança. Rodrigo, Flávia, Dani e Zeca, muito obrigada por trazerem sempre mais amor e alegria à minha vida.

Desde que entrei na pós-graduação, tive a sorte de encontrar amigos para a vida. Kelly querida, que hoje é como uma irmã, obrigada por toda a ajuda, ensinamentos, conversas e desabafos, desde o início. Kelly, May e Karine, mulheres da ciência, amigas, irmãs, exemplos, obrigada por tudo!

De volta à FMVZ pude conviver em família, especialmente no VRA, com muito trabalho, mas sem deixar de lado a diversão, com muitas risadas, churrascos, cantorias e danças. Devo muito a quem me deu a oportunidade de voltar, Prof. Marcílio. Muito obrigada por abrir as portas do VRA e do Laboratório de Andrologia (LA), pela confiança, apoio, carinho, por todos os ensinamentos e oportunidades de aprendizado com as várias colaborações. Muita alegria e orgulho de ter a sua orientação nesse trabalho!

E o que falar do time nota mil do LA! Obrigada Diego pelos ensinamentos, parceria e amizade. Como o Reche fala, “cuida bem do Di”, e é isso que sempre farei, pois é um amigo querido e estou sempre na torcida para que tenha um futuro brilhante. Obrigada Giu, por estar ao meu lado nos primeiros passos nas análises do LA, mas mais que tudo, por me fazer encarar o microfone para cantar sofrência, algo que quem não viu, jamais acreditará. Obrigada Ken, Alvinho, Rapha, Henrique, Mônica, Bia e Duda, pela ajuda constante, carinho, amizade e pelas risadas, que tornam tudo mais fácil e leve. E, lógico, o LA é apenas uma pequena parte da família VRA. Obrigada Brunão, até mesmo pelos sustos que me deixaram mais esperta,



Gabriel e Marcel, pela ajuda, amizade e convivência deliciosa na nossa sala gelada. E o que falar de uma amizade que nasceu na salinha gelada, corredores e talvez na copa, não importa. O que vale é que conheci um trio que enche meu coração de alegria, Maíra, Beto e Letícia. Quantas risadas (e choros), mas mais que tudo, quantos papos gostosos na porta do VRA, nos almoços e no Embú. Obrigada queridos pela linda amizade. Maíra, minha querida, obrigada também pela força, por me escutar e pela paciência, principalmente quando me apavorei frente aos desafios (e formulários). Não teria conseguido sem a ajuda de vocês!

Adriano e Vivian, que me ajudaram demais em todas as análises de citometria, ficando até tarde, depois de um longo dia de trabalho, com direito a muito papo sério, bem como boas risadas, muito obrigada. Adriano, gratidão ainda pela paciência e trabalho duro para a obtenção de um protocolo para as análises moleculares, sem a sua ajuda esse trabalho não seria possível. E sem dúvida esse agradecimento se estende a todos do Laboratório de Biologia dos Espermatozoides, por abrirem as portas, me ajudarem e ensinarem, em especial à Camila e Professora Mayra. Obrigada Professor Pietro pela ajuda para obter as amostras para esse estudo, mas mais que tudo pelo apoio durante o percurso, com a sala sempre aberta para tirar dúvidas e dar sugestões. Obrigada ainda ao seu grande time, Badá, Bernardo, Flavinha, Marcão, Laissa, Laís, Bruna, enfim, todos que fazem a família VRA ser essa alegria. Professoras Cláudia e Camila, obrigada pelo apoio, papos e risadas e, Professora Camila, por me colocar, mesmo que indiretamente, como representante discente na Congregação, função que adorei cumprir todos os anos. Muita gratidão à Professora Cris Pizzutto, pelas oportunidades e alegria em trabalhar em parceria, que me ensinou muito e, mais que tudo pela amizade. Agradeço muito a todos os Professores do VRA pelos ensinamentos e oportunidades. Entre estes, preciso agradecer especialmente ao Professor Visintin, que me ajudou a receber um prêmio na forma de um computador a altura de todas as análises que precisei fazer. Obrigada a todos os professores da FMVZ que me ajudaram, direta ou indiretamente neste trabalho, em especial à Cris Massoco, Macau, Paulo Mazza e Zezé. Além dos professores, agradeço a todos os funcionários da FMVZ e do VRA, em especial a Harumi, cuja ajuda e apoio foram fundamentais, Loide, Ira, Regina, Catia e Thais, por sempre terem paciência e tempo para ajudar.

Esse trabalho também só foi possível pelas parcerias com a CRV Brasil, em especial pela ajuda de Fabio Frigoni e Fernanda Marqui, e Seleon Biotecnologia, na

qual agradeço especialmente ao interesse e apoio constante de Bruno Grubisich, José Roberto Potiens, Breno Barros e Luiz Roberto Marques (Beto). Os resultados aqui obtidos são uma forma de agradecimento por todo apoio, espero que possam contribuir ao trabalho de vocês. Agradeço muito também ao Jovelino e Bento Mineiro e Maurício Nabuco, que sempre apoiaram os meus estudos e me ajudaram quando precisava estar em Botucatu.

Outra parceria fundamental para a realização desse trabalho foi com a IonMedicine, empresa que abriu as suas portas e permitiu que eu fizesse todas as análises metabolômicas, graças ao interesse em pesquisa e apoio de todos os seus executivos, Professores Irineu Massaia, José Mendes Aldrighi, José Fernando Aldrighi, Edson Guimarães Lo Turco e Daniel Zagatto, aos quais agradeço imensamente. E sem dúvida sou muito grata a toda equipe da Ion pela ajuda recebida, Professor Diogo de Oliveira Silva, André Filipe Rodrigues e a querida Juliana Peixinho. E enorme gratidão a Daniel Lebre, um grande parceiro, me ajudando e ensinando muito.

Agradeço ainda à USP e à FMVZ, que além da formação como veterinária, me proporcionaram ganho em conhecimento e crescimento pessoal durante o doutorado. Universidade e faculdade onde me sinto em casa. Por fim agradeço à FAPESP pela concessão de bolsa e financiamento deste estudo, sob o processo número 2019/20114-7, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), sob o código de financiamento 001. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP e CAPES.

*“All we have to decide is what to do with the time that is given us.”*

The Fellowship of the Ring - The Lord of the Rings (1954)

J.R.R. Tolkien

## RESUMO

LEITE, R. F. **Análise lipidômica, metabolômica e dos atributos espermáticos de touros com diferentes taxas de fertilidade e perfis de congelação de sêmen.** 2022. 383 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Fertilidade e viabilidade espermática pós-criopreservação são pontos fundamentais no sistema de produção animal que dependem da integridade e função de todas as estruturas que compõem o espermatozoide. Ademais, as biotécnicas aplicadas à pecuária, visando o incremento das taxas reprodutivas e, conseqüentemente, produtivas dos animais, dependem da criopreservação espermática. Entretanto, o uso de sêmen criopreservado de touros com subfertilidade ou touros férteis nos quais as células espermáticas perdem a sua viabilidade no processo de criopreservação, gera grandes prejuízos ao setor. O objetivo deste estudo foi associar técnicas funcionais e moleculares na avaliação do sêmen de touros com diferentes padrões de fertilidade e perfis de resistência à criopreservação espermática, com o intuito de identificar perfis funcionais e metabólicos em touros com padrões de subfertilidade e alta suscetibilidade ao processo de criopreservação. O estudo foi dividido em dois capítulos, o primeiro relacionado à taxa de fertilidade de touros usados em programas de IATF e o segundo, à maior e menor suscetibilidade ao processo de criopreservação. Em ambos foram realizadas análises espermáticas quanto às características funcionais (morfologia, cinética, integridade de membranas plasmática e acrossomal, atividade mitocondrial, integridade de DNA e *status* oxidativo) e perfis lipídico e metabólico por espectrometria de massas (LC-MS/MS). Nos dois capítulos as estatísticas englobaram: diferenças entre os grupos, correlação, análises de componentes principais (PCA) e discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA). No capítulo 1 foi realizada ainda a análise de interação, antes da comparação das variáveis entre os grupos, bem como análise de curva ROC com os metabólitos identificados. Neste capítulo foram analisadas amostras criopreservadas de touros Angus (*Bos taurus*) e Nelore (*Bos indicus*) com histórico de fertilidade conhecido em programas de IATF. O delineamento experimental usado foi um arranjo fatorial 2x2, com um fator sendo a raça (Angus vs Nelore) e o outro a fertilidade (alta vs baixa). Os grupos de alta fertilidade constituíram 40 amostras de touros Angus e 44 da raça Nelore, e os de baixa fertilidade. 40 amostras de Angus e 28 amostras de Nelore

(n=152). Os resultados observados demonstraram uma clara diferença entre as raças Angus e Nelore, principalmente no perfil lipídico e metabólico. Entre as amostras de alta e baixa fertilidade, os resultados funcionais e metabólicos indicam alterações na função mitocondrial, quebra da homeostase oxidativa e danos à membrana plasmática nas amostras de baixa fertilidade, principalmente na raça Angus. As diferenças observadas no perfil metabólico dos grupos de alta e baixa fertilidade permitiram ainda a identificação de potenciais biomarcadores de fertilidade com valores elevados de acurácia, sensibilidade e especificidade. No capítulo 2, foram utilizadas amostras de sêmen coletadas, no mesmo dia, de touros sob o mesmo manejo e padrão de fertilidade. As amostras foram divididas em dois grupos, com maior e menor suscetibilidade ao processo de criopreservação, considerando-se a redução maior ou menor que 20% na motilidade espermática pós-criopreservação. Amostras de oito touros foram selecionadas para cada grupo, com a distribuição homogênea de raças. As análises funcionais foram realizadas apenas em amostras de sêmen criopreservado, enquanto as análises metabólicas foram feitas em plasma seminal, células *in natura* e criopreservadas. Os resultados funcionais demonstraram uma clara diferença entre os grupos quanto ao *status* do metabolismo energético, presença de EROs e preservação ou não de estruturas celulares. Quanto às análises de perfis lipídico e metabólico, os resultados também demonstraram diferenças entre os grupos relacionadas ao seu *status* funcional em todas as amostras biológicas analisadas. Vale salientar, no entanto, a diferença quanto ao perfil metabólico das células espermáticas no momento pré-criopreservação. Esta observação indica que a manutenção da viabilidade espermática durante a criopreservação depende da capacidade das células em absorver e utilizar estes metabólitos antes do início do processo de diluição, resfriamento e congelação. Como a fertilidade e a suscetibilidade à criopreservação são características multifatoriais, os resultados deste estudo, principalmente pela correlação entre os perfis funcionais e metabólicos, proporcionam uma maior compreensão das vias envolvidas no metabolismo energético e status oxidativo das células espermáticas, bem como abrem caminho para a definição de biomarcadores para identificação precoce de touros com problemas de subfertilidade ou alta suscetibilidade à criopreservação.

Palavras-chave: espermatozoides, subfertilidade, criopreservação, perfil funcional, perfil metabólico, metabolismo energético, função mitocondrial, status oxidativo, membrana plasmática, DNA.

## ABSTRACT

LEITE, R. F. **Lipidomic, metabolomic and functional status analysis of sperm from bulls with different fertility rates and susceptibility to cryopreservation profiles**. 2022. 383 f. Thesis (Doctorate in Sciences) – School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2022.

Fertility and sperm quality and viability post-cryopreservation are fundamental to the animal production industry and are related to the integrity and function of all sperm structures. Besides, the technologies used on livestock to increase animal reproductive rates depend on sperm cryopreservation. However, the use of sperm from bulls with subfertility issues or from fertile bulls with a high loss of sperm viability during the cryopreservation process implies great losses for the livestock industry. The aim of this study was the association of functional and molecular analysis for the evaluation of sperm from bulls with different fertility rates and cryopreservation resistance profiles to identify functional and metabolic profiles from bulls with infertility and cryopreservation issues. The study was divided into two chapters, the first related to the fertility rate of bulls used in FTAI programs and the second to bull sperm with higher and lower susceptibility to cryopreservation. In both, sperm samples were analyzed to access their functional status (morphology, kinetics, plasma and acrosomal membrane integrity, mitochondrial activity, DNA integrity and oxidative status analysis) and their metabolic profiles (by LC-MS/MS analysis). The statistical analysis included: differences between groups by T-test, correlation, principal component analysis (PCA) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). In the first chapter, an interaction analysis was performed before comparing the variables between the groups and, considering the PCA results, a ROC curve analysis was also made with the metabolites detected. In this chapter, cryopreserved samples from Angus (*Bos taurus*) and Nellore (*Bos indicus*) bulls with known fertility history in FTAI programs were analyzed in a 2x2 factorial design, considering the breed (Angus x Nellore), the fertility factor (high vs low) as well as the interaction between those factors. High fertility groups were constituted of 40 Angus sperm samples and 44 Nellore sperm samples, and the low fertility groups of 40

Angus sperm samples and 28 Nellore sperm samples (n=152). Results showed a clear difference between the Angus and Nellore breeds, mainly in the lipid and metabolic profiles. Regarding the differences between the high and low fertility groups, the functional and metabolic results indicated the presence of mitochondrial disorders, oxidative stress, and damage to sperm structures, especially in low fertility Angus. The metabolic profile difference between high and low fertility groups allowed the identification of potential fertility biomarkers with high accuracy, sensitivity and specificity values. In chapter 2, sperm samples collected on the same day from bulls under the same management and fertility profile were used. Samples were divided into two groups, with higher and lower susceptibility to cryopreservation, considering a reduction of more or less than 20% in post-cryopreservation sperm motility. Samples of eight bulls with a homogeneous distribution of breeds were selected for each group. Functional analysis was performed only on cryopreserved sperm samples, while mass spectrometry analysis was performed on seminal plasma and pre and post-cryopreservation sperm cells. Functional results showed a great difference between the groups regarding energy metabolism status, ROS presence and integrity of cellular structures. Regarding the lipid and metabolic profile analysis, there were also differences between the groups in all biological samples analyzed, which corroborated their functional status. It is important to note, however, the metabolic profile difference between the groups observed in pre-cryopreservation sperm. This difference may indicate that the preservation of sperm viability during cryopreservation depends much more on its ability to absorb and use these metabolites before the dilution, cooling and freezing process. Considering that fertility and sperm susceptibility to cryopreservation are multifactorial, the results obtained in this study with the correlation between functional and metabolic profiles, provide a better understanding of the pathways involved in the sperm energy metabolism and oxidative status, as well indicate potential biomarkers for early identification of bulls with subfertility or high susceptibility to cryopreservation problems.

Keywords: sperm, subfertility, cryopreservation, metabolic profile, energy metabolism, mitochondrial function, oxidative status, plasma membrane, DNA

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Delineamento experimental do Capítulo I .....	61
Figura 2 - Gráficos dos resultados de morfologia espermática nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade.....	72
Figura 3 - Gráficos dos resultados de velocidades (cinética espermática) nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade.....	73
Figura 4 - Gráficos dos resultados de retilinearidade e linearidade (cinética espermática) nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade .....	74
Figura 5 - Gráficos dos resultados de ALH e BCF (cinética espermática) nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade.....	74
Figura 6 - Gráficos dos resultados de integridade de membranas plasmática e acrossomal nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade .....	75
Figura 7 - Gráfico dos resultados de suscetibilidade à fragmentação de DNA nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade .....	76
Figura 8 - Gráficos dos resultados de atividade mitocondrial nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade .....	77
Figura 9 - Gráficos dos resultados de potencial de membrana mitocondrial nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade.....	78
Figura 10 - Gráficos dos resultados de <i>status</i> oxidativo nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade.....	79
Figura 11 - PCA em apresentação <i>biplot</i> de variáveis da análise funcional espermática nos quatro grupos estudados (Aa, Ab, Na e Nb).....	81
Figura 12 - PCA em apresentação <i>biplot</i> de variáveis da análise funcional espermática nos grupos Angus de alta e baixa fertilidade .....	82
Figura 13 - PCA em apresentação <i>biplot</i> de variáveis da análise funcional espermática nos grupos Nelore de alta e baixa fertilidade .....	83
Figura 14 - Gráficos dos resultados das análises de colesterol, liso-PAF e DHA nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade .....	99
Figura 15 - Gráficos dos resultados das análises de esfingosinas nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade.....	100
Figura 16 - Gráficos dos resultados das análises de esfingomielinas nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade.....	102
Figura 17 - Gráficos dos resultados das análises de lisofosfatidilcolinas nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade.....	103
Figura 18 - Gráficos dos resultados das análises de fosfatidilcolinas nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade.....	105
Figura 19 - Gráficos dos resultados das análises de fosfatidilcolinas nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade.....	106
Figura 20 - Gráfico dos resultados das análises de fosfatidilcolinas nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade.....	107
Figura 21 - PCA em apresentação <i>biplot</i> de lipídios nos quatro grupos estudados (Aa, Ab, Na e Nb).....	108
Figura 22 - PLS-DA e VIP <i>scores</i> de lipídios nos quatro grupos estudados (Aa, Ab, Na e Nb) .....	109
Figura 23 - PCA em apresentação <i>biplot</i> de lipídios nos grupos Angus de alta e baixa fertilidade .....	110
Figura 24 - PLS-DA e VIP <i>scores</i> de lipídios nos grupos Angus de alta e baixa fertilidade.....	110

Figura 25 - PCA em apresentação <i>biplot</i> de lipídios nos grupos Nelore de alta e baixa fertilidade .....	111
Figura 26 - PLS-DA de lipídios nos grupos Nelore de alta e baixa fertilidade.....	112
Figura 27 - Gráficos dos resultados das análises de carnitinas nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade.....	116
Figura 28 - Gráficos dos resultados das análises de carnitinas nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade.....	117
Figura 29 - PCA em apresentação <i>biplot</i> de carnitinas nos quatro grupos estudados (Aa, Ab, Na e Nb).....	119
Figura 30 - PLS-DA de carnitinas nos quatro grupos estudados (Aa, Ab, Na e Nb).....	119
Figura 31 - PCA em apresentação <i>biplot</i> de carnitinas nos grupos Angus de alta e baixa fertilidade .....	120
Figura 32 - PLS-DA de carnitinas nos grupos Angus de alta e baixa fertilidade .....	121
Figura 33 - PCA em apresentação <i>biplot</i> de carnitinas nos grupos Nelore de alta e baixa fertilidade .....	122
Figura 34 - PLS-DA de carnitinas nos grupos Nelore de alta e baixa fertilidade.....	122
Figura 35 - Gráficos dos resultados das análises de glutatona e glutatona oxidada nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade .....	127
Figura 36 - Gráficos dos resultados das análises de aminoácidos nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade.....	130
Figura 37 - Gráficos dos resultados das análises de aminoácidos nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade.....	131
Figura 38 - Gráficos dos resultados das análises de aminoácidos nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade.....	133
Figura 39 - Gráficos dos resultados das análises de derivados de aminoácidos nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade .....	134
Figura 40 - PCA em apresentação <i>biplot</i> de peptídeos, aminoácidos e derivados nos quatro grupos estudados (Aa, Ab, Na e Nb) .....	136
Figura 41 - PLS-DA de peptídeos, aminoácidos e derivados nos quatro grupos estudados (Aa, Ab, Na e Nb).....	136
Figura 42 - PCA em apresentação <i>biplot</i> de peptídeos, aminoácidos e derivados nos grupos Angus de alta e baixa fertilidade .....	138
Figura 43 - PLS-DA de peptídeos, aminoácidos e derivados nos grupos Angus de alta e baixa fertilidade.....	138
Figura 44 - PCA em apresentação <i>biplot</i> de peptídeos, aminoácidos e derivados nos grupos Nelore de alta e baixa fertilidade.....	139
Figura 45 - PLS-DA de peptídeos, aminoácidos e derivados nos grupos Nelore de alta e baixa fertilidade.....	140
Figura 46 - Gráficos dos resultados das análises de ácidos orgânicos que apresentaram interação fertilidade*raça nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade .....	145
Figura 47 - Gráficos dos resultados das análises de ácidos orgânicos que apresentaram apenas efeitos fertilidade e raça nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade .....	147
Figura 48 - PCA em apresentação <i>biplot</i> de ácidos orgânicos nos quatro grupos estudados (Aa, Ab, Na e Nb) .....	148
Figura 49 - PLS-DA de ácidos orgânicos nos quatro grupos estudados (Aa, Ab, Na e Nb) .....	149
Figura 50 - PCA em apresentação <i>biplot</i> de ácidos orgânicos nos grupos Angus de alta e baixa fertilidade.....	150
Figura 51 - PLS-DA de ácidos orgânicos nos grupos Angus de alta e baixa fertilidade .....	150



Figura 52 - PCA em apresentação <i>biplot</i> de ácidos orgânicos nos grupos Nelore de alta e baixa fertilidade.....	151
Figura 53 - PLS-DA de ácidos orgânicos nos grupos Nelore de alta e baixa fertilidade.....	152
Figura 54 - Gráficos dos resultados das análises de adenina, adenosina AMP e AMP cíclico nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade .....	157
Figura 55 - Gráficos dos resultados das análises de guanosina e GMP nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade.....	158
Figura 56 - Gráficos dos resultados das análises de inosina e uridina nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade.....	158
Figura 57 - Gráficos dos resultados das análises de CMP, TMP e FMN nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade.....	159
Figura 58 - Gráficos dos resultados das análises dos derivados purínicos Hipoxantina e Xantina nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade.....	160
Figura 59 - Gráficos dos resultados das análises de Colina e Nicotinamida nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade.....	161
Figura 60 - PCA em apresentação <i>biplot</i> de nucleobases, nucleosídeos, nucleotídeos e demais metabólitos nos quatro grupos estudados (Aa, Ab, Na e Nb).....	162
Figura 61 - PLS-DA de nucleobases, nucleosídeos, nucleotídeos e demais metabólitos nos quatro grupos estudados (Aa, Ab, Na e Nb).....	162
Figura 62 - PCA em apresentação <i>biplot</i> de nucleobases, nucleosídeos, nucleotídeos e demais metabólitos nos grupos Angus de alta e baixa fertilidade .....	163
Figura 63 - PLS-DA de nucleobases, nucleosídeos, nucleotídeos e demais metabólitos nos grupos Angus de alta e baixa fertilidade .....	164
Figura 64 - PCA em apresentação <i>biplot</i> de nucleobases, nucleosídeos, nucleotídeos e demais metabólitos nos grupos Nelore de alta e baixa fertilidade.....	165
Figura 65 - PLS-DA de nucleobases, nucleosídeos, nucleotídeos e demais metabólitos nos grupos Nelore de alta e baixa fertilidade .....	165
Figura 66 - Curva ROC e <i>boxplot</i> de lipídios para ilustrar a acurácia e separação entre os grupos Angus de alta e baixa fertilidade.....	167
Figura 67 - Análise multivariada de biomarcadores da classe de lipídios em grupos Angus de alta e baixa fertilidade.....	168
Figura 68 - Curva ROC e <i>boxplot</i> de lipídios para ilustrar a acurácia e separação entre os grupos Nelore de alta e baixa fertilidade .....	169
Figura 69 - Análise multivariada de biomarcadores da classe de lipídios em grupos Nelore de alta e baixa fertilidade .....	169
Figura 70 - Curva ROC e <i>boxplot</i> de carnitinas para ilustrar a acurácia e separação entre os grupos Angus de alta e baixa fertilidade.....	170
Figura 71 - Análise multivariada de biomarcadores da classe de carnitinas em grupos Angus de alta e baixa fertilidade .....	171
Figura 72 - Curva ROC e <i>boxplot</i> de carnitinas para ilustrar a acurácia e separação entre os grupos Nelore de alta e baixa fertilidade .....	171
Figura 73 - Análise multivariada de biomarcadores da classe de carnitinas em grupos Nelore de alta e baixa fertilidade .....	172
Figura 74 - Curva ROC e <i>boxplot</i> de peptídeos aminoácidos e derivados para ilustrar a acurácia e separação entre os grupos Angus de alta e baixa fertilidade .....	173
Figura 75 - Análise multivariada de biomarcadores da classe peptídeos, aminoácidos e derivados em grupos Angus de alta e baixa fertilidade.....	173

Figura 76 - Curva ROC e <i>boxplot</i> de peptídeos, aminoácidos e derivados para ilustrar a acurácia e separação entre os grupos Nelore de alta e baixa fertilidade .....	174
Figura 77 - Análise multivariada de biomarcadores da classe peptídeos, aminoácidos e derivados em grupos Nelore de alta e baixa fertilidade .....	175
Figura 78 - Curva ROC e <i>boxplot</i> de ácidos orgânicos para ilustrar a acurácia e separação entre os grupos Angus de alta e baixa fertilidade.....	176
Figura 79 - Análise multivariada de biomarcadores de ácidos orgânicos em grupos Angus de alta e baixa fertilidade.....	176
Figura 80 - Curva ROC e <i>boxplot</i> de ácidos orgânicos para ilustrar a acurácia e separação entre os grupos Nelore de alta e baixa fertilidade .....	177
Figura 81 - Análise multivariada de biomarcadores de ácidos orgânicos em grupos Nelore de alta e baixa fertilidade.....	177
Figura 82 - Curva ROC e <i>boxplot</i> de demais metabólitos para ilustrar a acurácia e separação entre os grupos Angus de alta e baixa fertilidade.....	178
Figura 83 - Análise multivariada de biomarcadores de demais metabólitos em grupos Angus de alta e baixa fertilidade .....	179
Figura 84 - Curva ROC e <i>boxplot</i> de demais metabólitos para ilustrar a acurácia e separação entre os grupos Nelore de alta e baixa fertilidade .....	179
Figura 85 - Análise multivariada de biomarcadores de demais metabólitos em grupos Nelore de alta e baixa fertilidade .....	180
Figura 86 - Vias de ação da acetilcarnitina e da L-carnitina e seus ésteres no metabolismo energético das células espermáticas.....	196
Figura 87 - Formação de EROs durante a produção de energia das células espermáticas e metabólitos com ação antioxidante.....	198
Figura 88 - Vias do metabolismo energético das células espermáticas, destacando o ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa .....	203
Figura 89 - Delineamento experimental do Capítulo II.....	215
Figura 90 - Gráficos de morfologia espermática dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	218
Figura 91 - Gráficos de cinética espermática com motilidades total e progressiva dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	219
Figura 92 - Gráfico de cinética espermática com padrão de velocidade rápida e espermatozoides estáticos dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	220
Figura 93 - Gráficos de cinética espermática com retilinearidade, linearidade e ALH dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	221
Figura 94 - Gráficos de atividade mitocondrial dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	222
Figura 95 - Gráficos de potencial de membrana mitocondrial dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	223
Figura 96 - Gráficos de <i>status</i> oxidativo dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	224
Figura 97 - Gráfico de integridade de membrana plasmática dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	224
Figura 98 - Gráfico de suscetibilidade à fragmentação de DNA dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação.....	225

Figura 99 - Gráficos dos resultados das análises de colesterol em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	243
Figura 100 - Gráficos dos resultados das análises de DHA em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	243
Figura 101 - Gráficos dos resultados das análises da esfingosina Sph(d16:0) em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	244
Figura 102 - Gráficos dos resultados das análises de esfingomielinas em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	245
Figura 103 - Gráficos dos resultados das análises de lisofosfatidilcolinas em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	246
Figura 104 - Gráficos dos resultados das análises de fosfatidilcolinas em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	247
Figura 105 - Gráficos dos resultados das análises de fosfatidilcolinas em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	248
Figura 106 - PCA em apresentação <i>biplot</i> de lipídios em plasma seminal nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	249
Figura 107 - PCA em apresentação <i>biplot</i> de lipídios em células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	250
Figura 108 - PCA em apresentação <i>biplot</i> de lipídios em células espermáticas de sêmen criopreservado nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	251
Figura 109 - Gráficos dos resultados das análises de propionil-L-carnitina em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	256
Figura 110 - Gráficos dos resultados das análises de butiril-L-carnitina em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	256
Figura 111 - Gráficos dos resultados das análises de hexanoil-L-carnitina em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	257
Figura 112 - Gráficos dos resultados das análises de octanoil-L-carnitina em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	257
Figura 113 - Gráficos dos resultados das análises de O-decanoil-L-carnitina em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	258
Figura 114 - Gráficos dos resultados das análises de lauroil-L-carnitina em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	258
Figura 115 - Gráficos dos resultados das análises de tetradecanoilcarnitina em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	259

Figura 116 - Gráficos dos resultados das análises de palmitoil-L-carnitina em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	259
Figura 117 - Gráficos dos resultados das análises de estearoil-L-carnitina em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	260
Figura 118 - Gráficos dos resultados das análises de acetilcarnitina em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	260
Figura 119 - Gráficos dos resultados das análises de L-carnitina em células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	261
Figura 120 - PCA em apresentação <i>biplot</i> de carnitinas em plasma seminal nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	262
Figura 121 - PCA em apresentação <i>biplot</i> de carnitinas em células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	263
Figura 122 - PCA em apresentação <i>biplot</i> de carnitinas em células espermáticas de sêmen criopreservado nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	264
Figura 123 - Gráficos dos resultados das análises de glutatona e glutatona oxidada em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	271
Figura 124 - Gráficos dos resultados das análises dos ácidos aspártico e glutâmico em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	272
Figura 125 - Gráficos dos resultados das análises dos aminoácidos fenilalanina e glicina em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	273
Figura 126 - Gráficos dos resultados das análises dos aminoácidos isoleucina e leucina em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	274
Figura 127 - Gráficos dos resultados das análises dos aminoácidos metionina e prolina em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	275
Figura 128 - Gráficos dos resultados das análises dos aminoácidos tirosina e treonina em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	276
Figura 129 - Gráficos dos resultados das análises dos aminoácidos triptofano e citrulina em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	277
Figura 130 - Gráficos dos resultados das análises dos aminoácidos glutamina e hidroxiprolina em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	278
Figura 131 - Gráficos dos resultados das análises do derivado de aminoácido dimetilglicina em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	279
Figura 132 – PCA em apresentação <i>biplot</i> de peptídeos, aminoácidos e derivados em plasma seminal nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	280

Figura 133 - PCA em apresentação <i>biplot</i> de peptídeos, aminoácidos e derivados em células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	281
Figura 134 - PCA em apresentação <i>biplot</i> de peptídeos, aminoácidos e derivados em células espermáticas de sêmen criopreservado nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	282
Figura 135 - Gráficos dos resultados das análises do ácido $\alpha$ -cetoglutárico em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	287
Figura 136 - Gráficos dos resultados das análises do ácido láctico em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	287
Figura 137 - Gráficos dos resultados das análises do ácido málico em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	288
Figura 138 - Gráficos dos resultados das análises do ácido pirúvico em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	288
Figura 139 - Gráficos dos resultados das análises do ácido succínico em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	289
Figura 140 - Gráficos dos resultados das análises do ácido $\alpha$ -aminobutírico em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	289
Figura 141 - Gráficos dos resultados das análises do ácido $\gamma$ -aminobutírico em células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	290
Figura 142 - Gráficos dos resultados das análises do ácido adenilsuccínico em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	290
Figura 143 - Gráficos dos resultados das análises do ácido cítrico em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	291
Figura 144 - Gráficos dos resultados das análises do ácido isocítrico em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	291
Figura 145 - Gráficos dos resultados das análises do ácido pantotênico em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	292
Figura 146 - PCA em apresentação <i>biplot</i> de ácidos orgânicos em plasma seminal nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	293
Figura 147 - PCA em apresentação <i>biplot</i> de ácidos orgânicos em células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	294
Figura 148 - PCA em apresentação <i>biplot</i> de ácidos orgânicos em células espermáticas de sêmen criopreservado nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	295
Figura 149 - Gráficos dos resultados das análises de adenina e adenosina em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	301

Figura 150 - Gráficos dos resultados das análises de monofosfato de adenosina (AMP) e AMP cíclico em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	302
Figura 151 - Gráficos dos resultados das análises de guanosina e monofosfato de guanosina (GMP) em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	303
Figura 152 - Gráficos dos resultados das análises de mononucleotídeo de flavina (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD) em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	304
Figura 153 - Gráficos dos resultados das análises de inosina e uridina em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	305
Figura 154 - Gráficos dos resultados das análises de xantina e hipoxantina em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	306
Figura 155 - Gráficos dos resultados das análises de ácido úrico em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	307
Figura 156 - Gráficos dos resultados das análises de colina em células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	307
Figura 157 - Gráficos dos resultados das análises de nicotinamida em plasma seminal e células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	308
Figura 158 - PCA em apresentação <i>biplot</i> de nucleobases e derivados em plasma seminal nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	309
Figura 159 - PCA em apresentação <i>biplot</i> de nucleobases e derivados em células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	310
Figura 160 - PCA em apresentação <i>biplot</i> de nucleobases e derivados em células espermáticas de sêmen criopreservado nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	311

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados da análise de interação de fertilidade (alta vs baixa) e raça (Angus vs Nelore) de atributos espermáticos de amostras de sêmen criopreservado.....	67
Tabela 2 - Efeito do grupo genético (Angus e Nelore) sobre a fertilidade (alta e baixa) de atributos espermáticos de amostras de sêmen criopreservado.....	68
Tabela 3 - Efeito da fertilidade (alta e baixa) sobre os grupos genéticos (Angus e Nelore) de atributos espermáticos de amostras de sêmen criopreservado.....	69
Tabela 4 - Efeito fertilidade (alta e baixa) em variáveis sem interação de atributos espermáticos de amostras de sêmen criopreservado.....	70
Tabela 5 - Efeito raça (Angus e Nelore) em variáveis sem interação de atributos espermáticos de amostras de sêmen criopreservado.....	71

Tabela 6 - Resultados da análise de interação de fertilidade (alta vs baixa) e raça (Angus vs Nelore) de lipídios analisados em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado.....	95
Tabela 7 - Efeito do grupo genético (Angus e Nelore) sobre a fertilidade (alta e baixa) de lipídios analisados em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado .....	96
Tabela 8 - Efeito da fertilidade (alta e baixa) sobre os grupos genéticos (Angus e Nelore) de lipídios analisados em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado .....	97
Tabela 9 - Efeito fertilidade (alta e baixa) de lipídios analisados em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado.....	98
Tabela 10 - Efeito raça (Angus e Nelore) de lipídios analisados em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado.....	98
Tabela 11 - Resultados da análise de interação de fertilidade (Alta vs Baixa) e raça (Angus vs Nelore) de carnitinas analisadas em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado.....	113
Tabela 12 - Efeito do grupo genético (Angus e Nelore) sobre a fertilidade (alta e baixa) de carnitinas analisadas em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado .....	113
Tabela 13 - Efeito da fertilidade (alta e baixa) sobre os grupos genéticos (Angus e Nelore) de carnitinas analisadas em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado .....	114
Tabela 14 - Efeito fertilidade (alta e baixa) em carnitinas analisadas em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado.....	114
Tabela 15 - Efeito raça (Angus e Nelore) em carnitinas analisadas em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado.....	114
Tabela 16 - Resultados da análise de interação de fertilidade (Alta vs Baixa) e raça (Angus vs Nelore) de peptídeos, aminoácidos e derivados analisados em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado.....	124
Tabela 17 - Efeito do grupo genético (Angus e Nelore) na fertilidade (alta e baixa) de aminoácidos analisados em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado .....	125
Tabela 18 - Efeito da fertilidade (alta e baixa) no grupo genético (Angus e Nelore) de aminoácidos analisados em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado .....	125
Tabela 19 - Efeito fertilidade (alta e baixa) de peptídeos, aminoácidos e derivados analisados em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado.....	126
Tabela 20 - Efeito raça (Angus e Nelore) de peptídeos, aminoácidos e derivados analisados em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado .....	126
Tabela 21 - Resultados da análise de interação de fertilidade (alta vs baixa) e raça (Angus vs Nelore) de ácidos orgânicos analisados em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado.....	141
Tabela 22 - Efeito do grupo genético (Angus e Nelore) na fertilidade (alta e baixa) de ácidos orgânicos analisados em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado.....	142
Tabela 23 - Efeito da fertilidade (alta e baixa) no grupo genético (Angus e Nelore) de ácidos orgânicos analisados em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado.....	142
Tabela 24 - Efeito fertilidade (alta e baixa) de ácidos orgânicos analisados em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado.....	143
Tabela 25 - Efeito raça (Angus e Nelore) de ácidos orgânicos analisados em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado.....	143
Tabela 26 - Resultados da análise de interação de fertilidade (Alta vs Baixa) e raça (Angus vs Nelore) de metabólitos analisados (com e sem padrão) em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado.....	153

Tabela 27 - Efeito do grupo genético (Angus e Nelore) na fertilidade (alta e baixa) de metabólitos analisados em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado..	154
Tabela 28 - Efeito da fertilidade (alta e baixa) no grupo genético (Angus e Nelore) de metabólitos analisados em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado..	154
Tabela 29 - Efeito fertilidade (alta e baixa) de metabólitos analisados em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado.....	155
Tabela 30 - Efeito raça (Angus e Nelore) de ácidos orgânicos analisados em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado.....	155
Tabela 31 - Lipídios selecionados com acurácia acima de 0,8 para os grupos Angus de alta e baixa fertilidade .....	167
Tabela 32 - Lipídios selecionados com acurácia acima de 0,8 para os grupos Nelore de alta e baixa fertilidade .....	168
Tabela 33 - Carnitinas selecionadas com acurácia acima de 0,8 para os grupos Angus de alta e baixa fertilidade.....	170
Tabela 34 - Carnitinas selecionadas com acurácia acima de 0,8 para os grupos Nelore de alta e baixa fertilidade.....	171
Tabela 35 - Peptídeos, aminoácidos e derivados selecionados com acurácia acima de 0,8 para os grupos Angus de alta e baixa fertilidade.....	172
Tabela 36 - Peptídeos, aminoácidos e derivados selecionados com acurácia acima de 0,75 para os grupos Nelore de alta e baixa fertilidade .....	174
Tabela 37 - Ácidos orgânicos selecionados com acurácia acima de 0,8 para os grupos Angus de alta e baixa fertilidade .....	175
Tabela 38 - Ácidos orgânicos selecionados com acurácia acima de 0,8 para os grupos Nelore de alta e baixa fertilidade.....	177
Tabela 39 - Demais metabólitos selecionados com acurácia acima de 0,8 para os grupos Angus de alta e baixa fertilidade .....	178
Tabela 40 - Demais metabólitos selecionados com acurácia acima de 0,8 para os grupos Nelore de alta e baixa fertilidade.....	179
Tabela 41 - Resultados das análises espermáticas convencionais e funcionais entre os grupos com maior e menor suscetibilidade ao processo de criopreservação .....	217
Tabela 42 - Resultados de lipídios analisados em plasma seminal dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação.....	237
Tabela 43 - Resultados de lipídios analisados em células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	238
Tabela 44 - Resultados de lipídios analisados em células espermáticas de sêmen criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	239
Tabela 45 - Resultados de lipídios analisados em células espermáticas nos momentos pré e pós-criopreservação do grupo com maior suscetibilidade à criopreservação .....	241
Tabela 46 - Resultados de lipídios analisados em células espermáticas nos momentos pré e pós-criopreservação do grupo com menor suscetibilidade à criopreservação .....	242
Tabela 47 - Resultados de carnitinas analisadas em plasma seminal dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	252
Tabela 48 - Resultados de carnitinas analisadas em células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	253
Tabela 49 - Resultados de carnitinas analisadas em células espermáticas de sêmen criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	253
Tabela 50 - Resultados de carnitinas analisadas em células espermáticas nos momentos pré e pós-criopreservação do grupo com maior suscetibilidade à criopreservação .....	254



Tabela 51 - Resultados de carnitinas analisadas em células espermáticas nos momentos pré e pós-criopreservação do grupo com menor suscetibilidade à criopreservação .....	255
Tabela 52 - Resultados de peptídeos, aminoácidos e derivados analisados em plasma seminal dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação.....	265
Tabela 53 - Resultados de peptídeos, aminoácidos e derivados analisados em células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	266
Tabela 54 - Resultados de peptídeos, aminoácidos e derivados analisados em células espermáticas de sêmen criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	268
Tabela 55 - Resultados de peptídeos, aminoácidos e derivados analisados em células espermáticas nos momentos pré e pós-criopreservação do grupo com maior suscetibilidade à criopreservação .....	269
Tabela 56 - Resultados de peptídeos, aminoácidos e derivados analisados em células espermáticas nos momentos pré e pós-criopreservação do grupo com menor suscetibilidade à criopreservação .....	270
Tabela 57 - Resultados de ácidos orgânicos analisados em plasma seminal dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	283
Tabela 58 - Resultados de ácidos orgânicos analisados em células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	284
Tabela 59 - Resultados de ácidos orgânicos analisados em células espermáticas de sêmen criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	285
Tabela 60 - Resultados de ácidos orgânicos analisados em células espermáticas nos momentos pré e pós-criopreservação do grupo com maior suscetibilidade à criopreservação .....	286
Tabela 61 - Resultados de ácidos orgânicos analisados em células espermáticas nos momentos pré e pós-criopreservação do grupo com menor suscetibilidade à criopreservação .....	286
Tabela 62 - Resultados de metabólitos analisados em plasma seminal dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	296
Tabela 63 - Resultados de metabólitos analisados em células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	297
Tabela 64 - Resultados de metabólitos analisados em células espermáticas de sêmen criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	298
Tabela 65 - Resultados de metabólitos analisados em células espermáticas nos momentos pré e pós-criopreservação do grupo com maior suscetibilidade à criopreservação .....	299
Tabela 66 - Resultados de metabólitos analisados em células espermáticas nos momentos pré e pós-criopreservação do grupo com menor suscetibilidade à criopreservação.....	300
Tabela 67 - <i>Loadings</i> de PCA para as variáveis funcionais dos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade.....	355
Tabela 68 - <i>VIP scores</i> para as variáveis funcionais dos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade .....	355
Tabela 69 - <i>Loadings</i> de PCA para as variáveis funcionais dos grupos Angus de alta e baixa fertilidade .....	356
Tabela 70 - <i>VIP scores</i> para as variáveis funcionais dos grupos Angus de alta e baixa fertilidade .....	356
Tabela 71 - <i>Loadings</i> de PCA para as variáveis funcionais dos grupos Nelore de alta e baixa fertilidade .....	357

Tabela 72 - VIP scores para as variáveis funcionais dos grupos Nelore de alta e baixa fertilidade .....	357
Tabela 73 - <i>Loadings</i> de PCA e PLS-DA de lipídios dos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade .....	358
Tabela 74 - <i>Loadings</i> de PCA e PLS-DA de lipídios dos grupos Angus de alta e baixa fertilidade .....	359
Tabela 75 - <i>Loadings</i> de PCA e PLS-DA de lipídios dos grupos Nelore de alta e baixa fertilidade .....	359
Tabela 76 - <i>Loadings</i> de PCA e PLS-DA de carnitinas dos grupos Angus e Nelore de alta e baixa fertilidade.....	360
Tabela 77 - <i>Loadings</i> de PCA e PLS-DA de carnitinas dos grupos Angus de alta e baixa fertilidade .....	360
Tabela 78 - <i>Loadings</i> de PCA e PLS-DA de carnitinas dos grupos Nelore de alta e baixa fertilidade .....	360
Tabela 79 - <i>Loadings</i> de PCA e PLS-DA de peptídeos, aminoácidos e derivados dos grupos Angus e Nelore de alta e baixa fertilidade .....	361
Tabela 80 - <i>Loadings</i> de PCA e PLS-DA de peptídeos, aminoácidos e derivados dos grupos Angus de alta e baixa fertilidade .....	361
Tabela 81 - <i>Loadings</i> de PCA e PLS-DA de peptídeos, aminoácidos e derivados dos grupos Nelore de alta e baixa fertilidade.....	362
Tabela 82 - <i>Loadings</i> de PCA e PLS-DA de ácidos orgânicos dos grupos Angus e Nelore de alta e baixa fertilidade.....	362
Tabela 83 - <i>Loadings</i> de PCA e PLS-DA de ácidos orgânicos dos grupos Angus de alta e baixa fertilidade.....	363
Tabela 84 - <i>Loadings</i> de PCA e PLS-DA de ácidos orgânicos dos grupos Nelore de alta e baixa fertilidade.....	363
Tabela 85 - <i>Loadings</i> de PCA e PLS-DA de demais metabólitos dos grupos Angus e Nelore de alta e baixa fertilidade .....	363
Tabela 86 - <i>Loadings</i> de PCA e PLS-DA de demais metabólitos dos grupos Angus de alta e baixa fertilidade.....	364
Tabela 87 - <i>Loadings</i> de PCA e PLS-DA de demais metabólitos dos grupos Nelore de alta e baixa fertilidade.....	364
Tabela 88 - <i>Loadings</i> de PCA dos dados de lipídios em plasma seminal nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	372
Tabela 89 - <i>Loadings</i> de PCA na análise dos dados de lipídios em células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	372
Tabela 90 - <i>Loadings</i> de PCA na análise dos dados de lipídios em células espermáticas de sêmen criopreservado nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .	373
Tabela 91 - <i>Loadings</i> de PCA dos dados de carnitinas em plasma seminal nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	373
Tabela 92 - <i>Loadings</i> de PCA na análise dos dados de carnitinas em células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação.....	373
Tabela 93 - <i>Loadings</i> de PCA na análise dos dados de carnitinas em células espermáticas de sêmen criopreservado nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	374
Tabela 94 - <i>Loadings</i> de PCA dos dados de peptídeos, aminoácidos e derivados em plasma seminal nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação.....	374

Tabela 95 - <i>Loadings</i> de PCA na análise dos dados de peptídeos, aminoácidos e derivados em células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	374
Tabela 96 - <i>Loadings</i> de PCA na análise dos dados de peptídeos, aminoácidos e derivados em células espermáticas de sêmen criopreservado nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	375
Tabela 97 - <i>Loadings</i> de PCA dos dados de ácidos orgânicos em plasma seminal nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	375
Tabela 98 - <i>Loadings</i> de PCA na análise dos dados de ácidos orgânicos em células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	375
Tabela 99 - <i>Loadings</i> de PCA na análise dos dados de ácidos orgânicos em células espermáticas de sêmen criopreservado nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	376
Tabela 100 - <i>Loadings</i> de PCA dos dados de demais metabólitos em plasma seminal nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	376
Tabela 101 - <i>Loadings</i> de PCA na análise dos dados de demais metabólitos em células espermáticas de sêmen <i>in natura</i> nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	376
Tabela 102 - <i>Loadings</i> de PCA na análise dos dados nucleobases, nucleosídeos, nucleotídeos e demais metabólitos em células espermáticas de sêmen criopreservado nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação .....	377

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Correlação de variáveis funcionais no grupo Angus de alta fertilidade ( $n=40$ )...	351
Quadro 2 - Correlação de variáveis funcionais no grupo Angus de baixa fertilidade ( $n=40$ )	352
Quadro 3 - Correlação de variáveis funcionais no grupo Nelore de alta fertilidade ( $n=44$ )..	353
Quadro 4 - Correlação de variáveis funcionais no grupo Nelore de baixa fertilidade ( $n=28$ ) .....	354
Quadro 5 - Correlação variáveis funcionais e metabólicas, Angus de alta fertilidade ( $n=40$ ) .....	365
Quadro 6 - Correlação variáveis funcionais e metabólicas, Angus de baixa fertilidade ( $n=40$ ) .....	366
Quadro 7 - Correlação variáveis funcionais e metabólicas, Nelore de alta fertilidade ( $n=44$ ) .....	367
Quadro 8 - correlação variáveis funcionais e metabólicas, Nelore de baixa fertilidade ( $n=28$ ) .....	368
Quadro 9 - Correlação de variáveis funcionais no grupo com maior suscetibilidade à criopreservação ( $n=8$ ) .....	370
Quadro 10 - Correlação de variáveis funcionais no grupo com menor suscetibilidade à criopreservação ( $n=8$ ) .....	371
Quadro 11 - Correlação de variáveis funcionais e metabólicas no grupo com maior suscetibilidade à criopreservação ( $n=8$ ) .....	379
Quadro 12 - Correlação de variáveis funcionais e metabólicas no grupo com menor suscetibilidade à criopreservação ( $n=8$ ) .....	380

## LISTA DE ABREVIações

$\mu\text{L}$  - microlitros  
2NMES - Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico  
aa - aminoácidos  
Aa - Angus de alta fertilidade  
Ab - Angus de baixa fertilidade  
ALH - amplitude de deslocamento lateral da cabeça  
ADP - difosfato de adenosina  
AMP - monofosfato de adenosina  
ATP - trifosfato de adenosina  
AUC - *area under the ROC curve* (área sob a curva ROC)  
BCAAs - *branched chain amino acids* (Aminoácidos de cadeia ramificada)  
BCF - frequência de batimento flagelar cruzado  
CAC - ciclo do ácido cítrico  
CASA - *computer-assisted sperm analysis* (análise computadorizada da cinética espermática)  
CACT - carnitina acilcarnitina translocase  
CAT - carnitina aciltransferase  
CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal  
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
CMP - monofosfato de citidina  
CRIO - amostras de células espermáticas de sêmen criopreservado  
CTE - cadeia de transporte de elétrons  
DAB - 3,3'-diaminobenzidina  
DAGs - diacilgliceróis  
DHA - ácido docosahexaenoico  
DIC - microscopia de contraste de interferência diferencial  
DMG - dimetilglicina  
DNA - ácido desoxirribonucleico  
EROs - espécies reativas de oxigênio  
ESI - ionização por eletrospray  
FITC - isotiocianato de fluoresceína  
FITC-PSA - isotiocianato de fluoresceína conjugado à aglutinina *Pisum sativum*  
FMN - mononucleotídeo de flavina  
FMVZ - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
GLM - *general linear models* (método de mínimos quadrados para modelos lineares em geral)  
GMP - monofosfato de guanosina  
GPLs - glicerofosfolipídios ou fosfoglicerolipídios  
GSH - glutatona  
GSSG - glutatona oxidada  
H0 - hipótese de nulidade  
HPLC - cromatografia líquida de alta performance  
HPLC-MS/MS - cromatografia líquida de alta performance acoplada à espectrometria de massas  
IA - inseminação artificial  
IAM - índice de atividade mitocondrial

IATF - inseminação artificial em tempo fixo  
IC - intervalo de confiança de 95%  
IP - iodeto de propídio  
JC-1 - iodeto de 5,5',6,6' tetracloro 1,1,3,3' tetraetilbenzimidazolilcarbocianina  
LA - laranja de acridina  
LC - cromatografia líquida  
LIN - linearidade  
LPC - lisofosfatidilcolina  
M - molar  
MaS - grupo com maior suscetibilidade à criopreservação  
MDA - malondialdeído  
MeS - grupo com menor suscetibilidade à criopreservação  
mg - miligramas  
min – minuto(s)  
mL - mililitros  
mM - milimolar  
MRM - monitoramento de reações múltiplas  
MS - espectrometria de massas  
Na - Nelore de alta fertilidade  
NADPH - fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida  
nm - nanômetros  
NAM - nicotinamida  
Nb - Nelore de baixa fertilidade  
NMR - espectroscopia de ressonância magnética nuclear  
PAF - *platelet-activating factor* (fator ativador de plaquetas)  
PBS - tampão fosfato-salino  
PC - fosfatidilcolina  
PCA - análise de componentes principais  
PE - fosfatidiletanolaminas  
PFPP - pentafluorofenilpropil  
PIB - produto interno bruto  
PID - padrão interno deuterado  
PIV - produção *in vitro*  
PL - fosfolipídios  
PLS-DA - análise discriminante de mínimos quadrados parciais  
PMM - potencial de membrana mitocondrial  
PS - fosfatidilserina  
PUFAs - ácidos graxos poliinsaturados  
ROC - *receiver operating characteristic* (característica de operação do receptor)  
SEM - *standard error of the mean* (erro padrão da média)  
SM - esfingomielina  
SOD - superóxido dismutase  
Sph - esfingosina  
SPTZ - espermatozoide  
STR - retilinearidade  
SVM - *support vector machines* (máquina de vetores de suporte)  
TBARS - *thiobarbituric acid reactive substances* (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) - indica suscetibilidade à peroxidação lipídica

TBA - ácido tiobarbitúrico

TCA - ácido tricloroacético

TMP - monofosfato de timidina

USP - Universidade de São Paulo

VAP - velocidade média de percurso

VCL - velocidade curvilínea

VIP - *variable importance in projection* (variáveis importantes em projeção)

VSL - velocidade linear progressiva

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>35</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>37</b>
<b>2.1 FERTILIDADE</b> .....	<b>38</b>
<b>2.2 EFEITOS DA CRIOPRESERVAÇÃO</b> .....	<b>39</b>
<b>2.3 FUNÇÃO MITOCONDRIAL E ESTRESSE OXIDATIVO</b> .....	<b>41</b>
<b>2.4 MEMBRANAS E FUNÇÃO ESPERMÁTICA</b> .....	<b>43</b>
<b>2.5 PERFIL LIPÍDICO</b> .....	<b>46</b>
<b>2.6 PERFIL METABÓLICO</b> .....	<b>51</b>
<b>2.7 BENEFÍCIOS DA AVALIAÇÃO ASSOCIADA DE DIFERENTES ATRIBUTOS ESPERMÁTICOS E PERFIS MOLECULARES</b> .....	<b>54</b>
<b>3. CAPÍTULO 1</b> .....	<b>56</b>
<b>ANÁLISE LIPIDÔMICA, METABOLÔMICA E DOS ATRIBUTOS ESPERMÁTICOS DE TOUROS COM TAXAS DE FERTILIDADE DISTINTAS</b> .....	<b>56</b>
<b>3.1 HIPÓTESE</b> .....	<b>56</b>
<b>3.2 OBJETIVOS</b> .....	<b>56</b>
<b>3.3 EXPERIMENTO 1.1 - ANÁLISE DOS ATRIBUTOS ESPERMÁTICOS, FUNCIONALIDADE E STATUS OXIDATIVO, DE TOUROS COM TAXAS DE FERTILIDADE DISTINTAS</b> .....	<b>56</b>
<b>ARTIGO: FUNÇÃO ESPERMÁTICA E STATUS OXIDATIVO: IMPACTO NA FERTILIDADE DE TOUROS BOS TAURUS E BOS INDICUS EM PROGRAMAS DE IATF</b> .....	<b>57</b>
RESUMO.....	57
<b>3.3.1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>58</b>
<b>3.3.2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>60</b>
3.3.2.1 Delineamento Experimental.....	60
3.3.2.2 Análises Espermáticas .....	61
3.3.2.2.1 <i>Análise de morfologia espermática</i> .....	62
3.3.2.2.2 <i>Análise computadorizada da cinética espermática</i> .....	62
3.3.2.2.3 <i>Análise funcional por técnicas de citometria de fluxo e citoquímica</i> .....	63
3.3.2.2.4 <i>Avaliação do status oxidativo</i> .....	64
3.3.2.2.5 <i>Análise Estatística</i> .....	65
<b>3.3.3 RESULTADOS</b> .....	<b>67</b>
3.3.3.1 Morfologia espermática .....	71
3.3.3.2 Cinética espermática .....	72
3.3.3.3 Integridade de membranas plasmática e acrossomal.....	75
3.3.3.4 Integridade de DNA .....	75
3.3.3.5 Atividade mitocondrial e potencial de membrana mitocondrial .....	76
3.3.3.6 Status oxidativo .....	79
3.3.3.7 Análise de correlação .....	79
3.3.3.8 Análise de componentes principais .....	80

3.3.4 DISCUSSÃO .....	83
<b>3.4 EXPERIMENTO 1.2 - ANÁLISE LIPIDÔMICA E METABOLÔMICA DE TOUROS COM TAXAS DE FERTILIDADE DISTINTAS .....</b>	<b>88</b>
3.4.1 MATERIAL E MÉTODOS .....	88
3.4.1.1 Delineamento Experimental.....	88
3.4.1.2 Análises Moleculares.....	88
3.4.1.2.1 <i>Preparação das amostras</i> .....	89
3.4.1.2.2 <i>Extração lipídica e de metabólitos</i> .....	90
3.4.1.2.3 <i>Análise do perfil lipídico e metabólico de espermatozoides</i> .....	90
3.4.1.2.4 <i>Análise Estatística</i> .....	92
3.4.2 RESULTADOS .....	94
3.4.2.1 Lipídios .....	94
3.4.2.1.1 <i>Resultados de interação e diferenças entre os grupos</i> .....	94
3.4.2.1.2 <i>Resultados de PCA e PLS-DA</i> .....	107
3.4.2.2 Carnitinas .....	112
3.4.2.2.1 <i>Resultados de interação e diferenças entre os grupos</i> .....	112
3.4.2.2.2 <i>Resultados de PCA e PLS-DA</i> .....	118
3.4.2.3 Peptídeos, aminoácidos e derivados.....	123
3.4.2.3.1 <i>Resultados de interação e diferenças entre os grupos</i> .....	123
3.4.2.3.2 <i>Resultados de PCA e PLS-DA</i> .....	135
3.4.2.4 Ácidos Orgânicos .....	140
3.4.2.4.1 <i>Resultados de interação e diferenças entre os grupos</i> .....	141
3.4.2.4.2 <i>Resultados de PCA e PLS-DA</i> .....	148
3.4.2.5 Nucleobases, nucleosídeos, nucleotídeos e demais metabólitos.....	152
3.4.2.5.1 <i>Resultados de interação e diferenças entre os grupos</i> .....	153
3.4.2.5.2 <i>Resultados de PCA e PLS-DA</i> .....	161
3.4.3 POTENCIAIS BIOMARCADORES .....	166
3.4.3.1 Lipídios .....	167
3.4.3.2 Carnitinas .....	170
3.4.3.3 Peptídeos, aminoácidos e derivados.....	172
3.4.3.4 Ácidos orgânicos .....	175
3.4.3.5 Nucleobases, nucleosídeos, nucleotídeos e demais metabólitos.....	178
3.4.4 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO DE DADOS FUNCIONAIS E METABÓLICOS.....	180
3.4.5 DISCUSSÃO .....	186
Perfil lipídico .....	187
Perfil metabólico.....	193
3.4.6 CONCLUSÃO.....	211
<b>4. CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>213</b>



<b>ANÁLISE LIPIDÔMICA, METABOLÔMICA E DOS ATRIBUTOS ESPERMÁTICOS DE TOUROS COM DIFERENTES PERFIS DE CONGELAÇÃO DE SÊMEN .....</b>	<b>213</b>
<b>4.1 HIPÓTESE .....</b>	<b>213</b>
<b>4.2 OBJETIVOS.....</b>	<b>213</b>
<b>4.3 EXPERIMENTO 2.1 - Análise dos atributos espermáticos, funcionalidade e <i>status</i> oxidativo, de touros com diferentes perfis de congelação de sêmen. ....</b>	<b>214</b>
4.3.1 MATERIAL E MÉTODOS .....	214
4.3.1.1 Delineamento Experimental.....	214
4.3.1.2 Criopreservação Seminal .....	215
4.3.1.3. Análises Espermáticas .....	216
4.3.1.4. Análise Estatística .....	216
4.3.2. RESULTADOS .....	216
4.3.2.1 Morfologia espermática .....	218
4.3.2.2 Cinética espermática .....	218
4.3.2.3 Atividade mitocondrial e potencial de membrana mitocondrial .....	221
4.3.2.4 <i>Status</i> oxidativo .....	223
4.3.2.5 Integridade de membranas plasmática e acrossomal.....	224
4.3.2.6 Integridade de DNA .....	225
4.3.2.7 Análise de correlação .....	225
4.3.3 DISCUSSÃO .....	226
<b>4.4 - EXPERIMENTO 2.2 - Análise lipidômica e metabolômica de touros de touros com diferentes perfis de congelação de sêmen. ....</b>	<b>232</b>
4.4.1 MATERIAL E MÉTODOS .....	232
4.4.1.1 Delineamento Experimental.....	232
4.4.1.2 Análises Moleculares.....	232
4.4.1.2.1 <i>Preparação das amostras</i> .....	233
4.4.1.2.2. <i>Extração lipídica e de metabólitos</i> .....	233
4.4.1.2.3 <i>Análise do perfil lipídico e metabólico de espermatozoides</i> .....	233
4.4.1.2.4 <i>Análise Estatística</i> .....	234
4.4.2 RESULTADOS .....	235
4.4.2.1 Lipídios .....	236
4.4.2.1.1 <i>Diferenças entre os grupos</i> .....	236
4.4.2.1.2 <i>Resultados de PCA</i> .....	249
4.4.2.2 Carnitinas .....	252
4.4.2.2.1 <i>Diferenças entre os grupos</i> .....	252
4.4.2.2.2 <i>Resultados de PCA</i> .....	261
4.4.2.3 Peptídeos, aminoácidos e derivados.....	264
4.4.2.3.1 <i>Diferenças entre os grupos</i> .....	265
4.4.2.3.2 <i>Resultados de PCA</i> .....	279

4.4.2.4 Ácidos Orgânicos .....	282
4.4.2.4.1 Diferenças entre os grupos.....	283
4.4.2.4.2 Resultados de PCA .....	292
4.4.2.5 Nucleobases, nucleosídeos, nucleotídeos e demais metabólitos .....	295
4.4.2.5.1 Diferenças entre os grupos.....	296
4.4.2.5.2 Resultados de PCA .....	308
4.4.3 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO DE DADOS FUNCIONAIS E METABÓLICOS.....	311
4.4.4 DISCUSSÃO .....	314
Perfil de lipídios e carnitinas.....	315
Perfil de aminoácidos, ácidos orgânicos, nucleosídeos e derivados .....	323
4.4.5 CONCLUSÃO.....	334
<b>Referências .....</b>	<b>336</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>351</b>
<b>APÊNDICE 1 - QUADROS DE CORRELAÇÃO DO EXPERIMENTO 1.1.....</b>	<b>351</b>
<b>APÊNDICE 2 - LOADINGS DAS ANÁLISES DE PCA E VIP SCORES DE PLS-DA DO EXPERIMENTO 1.1 .....</b>	<b>355</b>
<b>APÊNDICE 3 - LOADINGS DAS ANÁLISES DE PCA E PLS-DA DO EXPERIMENTO 1.2.....</b>	<b>358</b>
<b>APÊNDICE 4 – QUADROS DE CORRELAÇÃO DO CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>365</b>
<b>APÊNDICE 5 – QUADROS DE CORRELAÇÃO DO EXPERIMENTO 2.1.....</b>	<b>370</b>
<b>APÊNDICE 6 - LOADINGS DAS ANÁLISES DE PCA DO EXPERIMENTO 2.2 .....</b>	<b>372</b>
<b>APÊNDICE 7 – QUADROS DE CORRELAÇÃO CAPÍTULO 2.....</b>	<b>378</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>381</b>
<b>Anexo 1 – Artigo publicado .....</b>	<b>382</b>
<b>Anexo 2 – Parceria com a IonMedicine .....</b>	<b>383</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O agronegócio brasileiro vem contribuindo de forma significativa e constante para a economia do país, com participação de 26,6% do PIB, ou quase R\$2 trilhões, em 2020 (CEPEA/USP, 2021). Destacam-se neste setor as cadeias bovinas produtivas de carne e leite, com participação, em 2020, de 10,5% do PIB brasileiro, somando R\$798 bilhões (ABIEC, 2020; CEPEA/USP, 2021). Apesar de ocupar posição destacada em produção e exportação, o potencial de crescimento para a pecuária é promissor. No entanto, para que o incremento na produção ocorra com sustentabilidade social e ambiental, é necessário o aumento de produtividade. Entre os fatores que podem aumentar a produtividade do rebanho bovino, destaca-se a aplicação de biotécnicas reprodutivas, como a inseminação artificial (IA), seja com observação de cio ou em tempo fixo (IATF), bem como a produção *in vitro* (PIV) de embriões, as quais trazem inúmeras vantagens, permitindo melhor aproveitamento de animais de elevado mérito genético, determinação do sexo da prole, maior eficiência em programas de melhoramento genético, entre outras (LONERGAN, 2007; HALL, HINRICHS, *et al.*, 2013).

Estas biotécnicas reprodutivas são fortemente influenciadas pelo efeito do macho e observa-se, a campo, touros que apresentam taxas de fertilidade reduzidas, mesmo com características espermáticas dentro dos padrões recomendados. Outra observação frequente é de touros que apresentam alta qualidade espermática no sêmen ejaculado, mas que possuem uma perda bastante pronunciada tanto da qualidade espermática como da fertilidade quando submetidos à criopreservação do sêmen, processo fundamental para a logística e aplicação das biotécnicas reprodutivas (HOLT, 2000; LAYEK, MOHANTY, *et al.*, 2016; CELEGHINI, ARRUDA, *et al.*, 2017). Um aspecto que também pode influenciar a fertilidade de um determinado touro é sua origem genética. Diversos estudos indicam que touros de origem europeia, quando utilizados em regiões com elevação grande da temperatura, especialmente no verão, possuem uma redução na qualidade espermática e fertilidade (NICHI, BOLS, *et al.*, 2006; KASTELIC e THUNDATHIL, 2008; DIKMEN, MATEESCU, *et al.*, 2018).

Neste contexto, a avaliação da qualidade seminal é um dos critérios utilizados para a identificação e seleção de touros com maior fertilidade. No entanto, esta avaliação ainda constitui um desafio, já que a qualidade seminal sofre influência de diversas variáveis e, como supracitado, é afetada ainda pelo processo de

criopreservação (O'CONNELL, MCCLURE e LEWIS, 2002; UTT, 2016). Além disso, é fundamental levar em consideração o fato de que as células espermáticas são altamente especializadas e dotadas de diferentes atributos específicos que permitem que as mesmas sejam capazes de realizar a sua função de fecundar o oócito (GRAHAM e MOCÉ, 2005; AITKEN, 2006; MORRELL, NONGBUA, *et al.*, 2017). Estas células possuem uma morfologia complexa, com diferentes composições de membrana, habilidade de deslocamento ativo, citoplasma extremamente reduzido e, ainda, a capacidade de passar por uma sequência de fenômenos biológicos para permitir que o material genético, contido nas mesmas, seja fundido ao material genético dos oócitos para a formação do zigoto com a recomposição do número diploide de cromossomos da espécie (GADELLA, TSAI, *et al.*, 2008; GRAHAM e MOCÉ, 2005; KATO e NAGAO, 2015; GADELLA, 2008).

Durante muitos anos, a avaliação da qualidade espermática levava em conta apenas o exame convencional constituído pela análise de motilidade, vigor, concentração e morfologia (BARTH e OKO, 1989; AITKEN, 2006; KIZILAY e ALTAY, 2017). Esta abordagem ainda é de extrema importância pela praticidade e baixo custo da avaliação, que permite identificar amostras de baixa qualidade. No entanto, sabe-se que não são suficientes para prever a capacidade fecundante de uma determinada amostra seminal e, como há vários fatores que podem afetar tanto a fertilidade, quanto a suscetibilidade ao processo de criopreservação, é necessário a aplicação de técnicas mais eficientes (AITKEN, 2006; WANG e SWERDLOFF, 2014). Atualmente, podem ser empregadas técnicas mais avançadas para a avaliação da qualidade espermática, tais como a análise computadorizada da cinética espermática (CASA), uso de sondas fluorescentes associadas à citometria de fluxo, além de técnicas bioquímicas desenvolvidas para análises de parâmetros mais específicos dos atributos espermáticos (GRAHAM, 2001; NICHI, GOOVAERTS, *et al.*, 2007; LOSANO, ANGRIMANI, *et al.*, 2015; GLIOZZI, TURRI, *et al.*, 2017). Estas técnicas minimizam a subjetividade das avaliações convencionais e permitem avaliações mais minuciosas da integridade e funcionalidade das estruturas celulares (ALVES, ARRUDA, *et al.*, 2017). Entretanto, são poucos os estudos que correlacionam estas análises com a fertilidade. Além disto, é fundamental não apenas identificar os fatores envolvidos nos problemas relacionados aos machos, mas entender os mecanismos que levam aos problemas de fertilidade. Para tal, além dos testes que avaliam os diferentes atributos espermáticos, é de vital

importância o estudo dos aspectos moleculares envolvidos na eficiência reprodutiva (DU PLESSIS, KASHOU, *et al.*, 2011; ALVES, ARRUDA, *et al.*, 2017). Não obstante, a disponibilidade e avanços recentes em técnicas como a espectrometria de massas (MS), ressonância magnética nuclear (MNR), espectroscopia Raman, entre outras, permitem a avaliação de perfis moleculares detalhados de amostras seminais (LALANCETTE, FAURE e LECLERC, 2006; PEDDINTI, NANDURI, *et al.*, 2008; DU PLESSIS, KASHOU, *et al.*, 2011; KUMAR, KROETSCH, *et al.*, 2015).

A relação da qualidade seminal com a fertilidade é um dos pontos fundamentais no sistema de produção, e essa qualidade depende da integridade e função de todas as estruturas que compõem a célula espermática (CELEGHINI, ARRUDA, *et al.*, 2017). A associação de várias técnicas, com o objetivo de se obter uma avaliação mais abrangente de atributos e perfis moleculares, abrangendo diferentes funções e vias das células espermáticas, pode permitir o desenvolvimento de métodos mais precisos para a identificação de reprodutores com maior qualidade espermática, alta fertilidade, bem como menor suscetibilidade ao processo de criopreservação de sêmen. Contudo, o estudo molecular detalhado do perfil seminal de touros, bem como a associação de biomarcadores com qualidade espermática e fertilidade ainda não foi elucidado. Portanto, o objetivo deste estudo foi associar técnicas convencionais, funcionais e moleculares na avaliação do sêmen de touros com diferentes padrões de fertilidade e perfis de resistência à criopreservação espermática, com o intuito de identificar, futuramente, possíveis marcadores para detecção de animais de alta eficiência reprodutiva.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

A presente revisão de literatura tem como intuito compilar informações relacionadas a padrões de fertilidade de touros, efeitos do processo de criopreservação de células espermáticas, suas características funcionais e perfis de lipídios e outros metabólitos, bem como a importância da associação de dados funcionais e moleculares para a melhor compreensão das vias fisiológicas dos espermatozoides relacionadas à fertilidade e suscetibilidade à criopreservação.

## 2.1 FERTILIDADE

A fertilidade é um dos parâmetros mais importantes para a pecuária bovina, com grande impacto econômico. A fertilidade do macho está relacionada com a sua capacidade de produzir espermatozoides com a habilidade de fecundar o oócito, gerando descendentes. A queda na fertilidade de touros impacta diretamente a taxa de concepção de rebanhos e pode ser afetada por diferentes fatores, como manejo, estresse, genética e, em biotécnicas reprodutivas, no processo de criopreservação seminal (AITKEN, 2006; VELHO, MENEZES, *et al.*, 2018).

No Brasil, investimentos em melhoramento genético, visando aumentar a taxa reprodutiva e produtiva dos animais, levam à utilização intensa de cruzamentos industriais. O fato de touros *Bos taurus* possuírem maior precocidade sexual, ganho de peso, melhor acabamento de carcaça e maior produção leiteira, e que touros *Bos indicus* têm maior adaptação ao clima tropical, mais resistência a endo e ectoparasitas e maior habilidade materna, tornaram o cruzamento entre raças destas subespécies desejável e muito utilizado, considerando-se que seus descendentes terão características de ambos (RESTLE, PASCOAL, *et al.*, 2002; TRAORÉ, MARKEMANN, *et al.*, 2017). No entanto, tais ganhos genéticos podem ser impactados negativamente pela redução da qualidade espermática e fertilidade de touros de raças europeias (*Bos taurus*) em áreas com temperaturas elevadas, observadas nos últimos anos inclusive durante o verão em regiões de clima temperado (MOTHA e BAIER, 2005; MARACCHI, SIROTENKO e BINDI, 2005; VOGEL, ZSCHEISCHLER, *et al.*, 2019), devido à maior suscetibilidade dos mesmos ao estresse térmico (NICHI, BOLLS, *et al.*, 2006; DIKMEN, MATEESCU, *et al.*, 2018; SABÉS-ALSINA, LUNDEHEIM, *et al.*, 2019; LEES, SEJIAN, *et al.*, 2019). Neste contexto, é importante salientar, que subfertilidade de um touro, utilizado para monta natural, IA e IATF, tem um impacto muito maior do que a subfertilidade da fêmea, já que o primeiro resulta em um número elevado de vacas vazias, atrasos na concepção, prolongando a estação de partos e reduzindo o peso dos bezerros no desmame e, conseqüentemente, em uma redução significativa da taxa reprodutiva e produtiva do rebanho (KASTELIC e THUNDATHIL, 2008).

Por outro lado, a identificação e utilização de touros com alta fertilidade geram ganhos produtivos importantes, os quais podem ser evidenciados pelo exemplo a seguir, utilizando um modelo de mil matrizes. As mesmas são selecionadas de forma homogênea, para permitir a avaliação do efeito touro, e submetidas a duas IATFs na

estação de monta. Partindo-se de um ponto de referência de um touro que gera uma taxa de prenhez de 40% nas duas IATFs, esse modelo resultaria na obtenção de 640 bezerros. A utilização de um touro com maior fertilidade, com um incremento, por exemplo, de 20% na taxa de prenhez, para 60%, ocasionaria um incremento de 200 bezerros na estação de monta. Para ilustrar esse incremento em ganhos financeiros, podemos considerar o peso do bezerro de 170 Kg ao desmame e, portanto, a obtenção de um peso total de 43 toneladas (840 bezerros, com 15 kg adicionais de bezerros nascidos na prenhez da primeira IATF, portanto um mês antes). Desta forma, esse aumento de 20% na taxa de fertilidade do touro, resultaria em um ganho final de R\$516 mil em kg de bezerros na estação de monta, partindo-se de um valor de R\$12/Kg do bezerro desmamado. Além disso, ao se considerar a taxa de prenhez acumulada, há ainda uma redução significativa do custo por prenhez, gerando ainda uma economia de aproximadamente 25% no investimento em IATF (BARUSELLI, 2019).

A relação entre fertilidade e qualidade espermática é de grande importância para a produção animal, entretanto, até o momento não foram identificadas análises isoladas ou marcadores moleculares eficientes para assegurar a fertilidade de uma amostra seminal. Os elevados investimentos da cadeia pecuária bovina em animais para melhoramento genético e em touros, com valores que alcançaram R\$2,07 bilhões e R\$1,95 bilhão, respectivamente, apenas em 2019, corroboram com a importância de avanços em técnicas com capacidade de prever antecipadamente a fertilidade de touros, as quais trariam enormes benefícios para o sucesso econômico da pecuária (VELHO, MENEZES, *et al.*, 2018; ABIEC, 2020).

## **2.2 EFEITOS DA CRIOPRESERVAÇÃO**

Fundamental para a aplicação de biotécnicas reprodutivas que visam o aumento da produção animal, a criopreservação do sêmen, pode ocasionar a queda na qualidade espermática. Os efeitos da criopreservação na função espermática e taxa de fertilidade, bem como a maior ou menor suscetibilidade aos efeitos da técnica, têm sido pesquisados extensivamente em várias espécies, principalmente em bovinos. É importante considerar que o processo de criopreservação seminal e utilização do sêmen pós-descongelamento é um processo sequencial que envolve diluição, adição de crioprotetores, resfriamento (fase positiva), congelamento (fase negativa), armazenagem em nitrogênio líquido (-196°C) e descongelamento rápida (30

segundos) para a temperatura equivalente à corporal (O'CONNELL, MCCLURE e LEWIS, 2002; UGUR, SABER ABDELRAHMAN, *et al.*, 2019). Distintamente de outras células, os espermatozoides poderiam ser considerados menos suscetíveis à criopreservação devido ao seu citoplasma reduzido com pouco conteúdo aquoso e à elevada fluidez de sua membrana (BAILEY, MORRIE e CORMIER, 2003; BÜYÜKLEBLEBICI, TUNCER, *et al.*, 2014). No entanto, mesmo o espermatozoide bovino, que é considerado um dos mais resistentes à criopreservação, apresentam perda da qualidade seminal com menor viabilidade espermática pós-descongelação. Estima-se uma taxa de 50% de sobrevivência celular e redução na qualidade dos espermatozoides que sobrevivem ao processo (WATSON, 2000; LAYEK, MOHANTY, *et al.*, 2016; BAILEY, BILODEAU e CORMIER, 2000; PETRUNKINA, 2007). Dentre os fatores relacionados às crioinjúrias, destacam-se o choque térmico, a formação de cristais de gelo intra e extracelulares, o estresse osmótico e tóxico que pode ser causado por crioprotetores (KUMAR, PRASAD, *et al.*, 2019). Neste contexto, mesmo os espermatozoides que sobrevivem ao processo de criopreservação podem ter seu *status* funcional comprometido (BAILEY, BILODEAU e CORMIER, 2000; VERNET, AITKEN e DREVET, 2004; NICHI, GOOVAERTS, *et al.*, 2007; LAYEK, MOHANTY, *et al.*, 2016).

Há vários estudos que analisam os efeitos da criopreservação, seja no desencadeamento de: estresse oxidativo (BILODEAU, CHATTERJEE, *et al.*, 2000; NICHI, BOLS, *et al.*, 2006; KOPPERS, DE IULIIS, *et al.*, 2008; AGARWAL, VIRK, *et al.*, 2014), danos às mitocôndrias, resultantes da produção excessiva de fatores pró-oxidativos (AMARAL, LOURENÇO, *et al.*, 2013; GALLON, MARCHETTI, *et al.*, 2006; O'CONNELL, MCCLURE e LEWIS, 2002; LOSANO, ANGRIMANI, *et al.*, 2018) e danos à integridade do DNA, principalmente pela ação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (AITKEN e CURRY, 2011; AGARWAL, VIRK, *et al.*, 2014; SIMÕES, FEITOSA, *et al.*, 2013). Estudos avaliam ainda alterações prejudiciais na composição das membranas plasmática e acrossomal e na permeabilidade das mesmas. Estas alterações, causadas pelo estresse mecânico, devido aos efeitos de temperatura e osmóticos, ou como resultado da ação de EROs, podem causar o extravasamento de enzimas intracelulares e permeabilidade não seletiva de moléculas, como cálcio e colesterol (BAILEY, MORRIE e CORMIER, 2003; JANUSKAUSKAS, JOHANNISSON e RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2003; CELEGHINI, DE ARRUDA, *et al.*, 2007; GADELLA, TSAI, *et al.*, 2008; MARTÍNEZ-SOTO,



LANDERAS e GADEA, 2013; MANDAL, BADIYAKAR e CHAKRABARTY, 2014; AITKEN e DREVET, 2020). Por fim, há estudos que relacionam a criopreservação a alterações nos processos de capacitação, hiperativação e reação acrossomal, impedindo os mesmos ou promovendo a precocidade destes eventos (criocapacitação) (BAILEY, BILODEAU e CORMIER, 2000; AITKEN, RYAN, *et al.*, 2004; AITKEN, 2017), redução da ligação espermática com a zona pelúcida por danos às membranas e conseqüentemente aos receptores contidos nas mesmas (BAILEY, BILODEAU e CORMIER, 2000; LOSANO, ANGRIMANI, *et al.*, 2015), e apoptose desencadeada por estresse oxidativo e peroxidação lipídica, o que pode gerar um ciclo contínuo de redução oxidativa, acúmulo de EROs e novos danos celulares (ORTEGA-FERRUSOLA, SOTILLO-GALÁN, *et al.*, 2008; AITKEN e BAKER, 2013).

A partir destes estudos, novas abordagens para melhorar a qualidade espermática pós-descongelamento têm sido avaliadas e aplicadas, visando obter uma maior eficiência no uso de sêmen congelado. Parte deles tem como foco a importância fisiológica das EROs para a célula espermática, o fato de a mitocôndria ser a principal fonte de agentes pró-oxidantes e o impacto da criopreservação na homeostase oxidativa (KOPPERS, DE IULIIS, *et al.*, 2008; AITKEN e CURRY, 2011; BLUMER, RESTELLI, *et al.*, 2012; LOSANO, ANGRIMANI, *et al.*, 2018; KUMAR, PRASAD, *et al.*, 2019; UGUR, SABER ABDELRAHMAN, *et al.*, 2019).

### **2.3 FUNÇÃO MITOCONDRIAL E ESTRESSE OXIDATIVO**

Com grande importância para a funcionalidade e metabolismo das células espermáticas, a mitocôndria atua na homeostase de cálcio, regulação osmótica, modulação do estado oxidativo, e geração de energia por meio da produção de ATP, energia essencial para a movimentação espermática pelo batimento flagelar (KOPPERS, DE IULIIS, *et al.*, 2008; LOSANO, ANGRIMANI, *et al.*, 2018). No entanto, a contribuição da mitocôndria para a capacidade energética espermática ainda não é muito clara, com estudos demonstrando variações na mesma em diferentes condições biológicas e espécies envolvidas nos experimentos (GALLON, MARCHETTI, *et al.*, 2006). Ainda assim, a mitocôndria possui uma grande capacidade de produção de energia, principalmente por meio da fosforilação oxidativa e, em situações em que a sua estrutura é comprometida, como pela alteração da permeabilidade ou perda do potencial de sua membrana, há perda da

homeostase oxidativa da célula, com acúmulo de EROs (KOPPERS, DE IULIIS, *et al.*, 2008; AMARAL, LOURENÇO, *et al.*, 2013; LOSANO, ANGRIMANI, *et al.*, 2018).

A mitocôndria é o principal sítio de formação de EROs intracelular, pois, o ambiente mitocondrial possui alta concentração de oxigênio e elétrons, que atuam na redução do oxigênio em água, durante a fosforilação oxidativa (NICHI, BOLS, *et al.*, 2006; AITKEN e CURRY, 2011). Entretanto, o escape de parte destes elétrons dá origem as EROs, como o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ), o primeiro a ser formado e, numa reação em cascata, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) respectivamente (NICHI, GOOVAERTS, *et al.*, 2007; KOPPERS, DE IULIIS, *et al.*, 2008; LOSANO, ANGRIMANI, *et al.*, 2017). É importante salientar que as células espermáticas possuem um citoplasma extremamente reduzido e, conseqüentemente, uma menor capacidade antioxidante em comparação com outros tipos celulares, portanto são mais suscetíveis ao desequilíbrio na homeostase oxidativa e, por conseguinte, ao estresse oxidativo (AMARAL, LOURENÇO, *et al.*, 2013; AGARWAL, VIRK, *et al.*, 2014). Ademais, a disfunção mitocondrial com o conseqüente estresse oxidativo causa uma toxicidade prejudicial não apenas ao espermatozoide afetado, mas também aos que estão ao seu redor. Espermatozoides com danos estruturais e mortos geram mais EROs por meio das vias de ativação de fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADPH) oxidase, com ação na membrana plasmática, e de oxidases de aminoácidos aromáticos, no processo de apoptose (BAILEY, BILODEAU e CORMIER, 2000; AITKEN e BAKER, 2013; GUALTIERI, KALTHUR, *et al.*, 2021).

Embora as EROs sejam essenciais em diversos processos fisiológicos do espermatozoide, como a hiperativação e capacitação espermáticas, reação acrossomal e ligação à zona pelúcida (AITKEN, 2017; AITKEN e DREVET, 2020; GADELLA, 2008), um quadro de estresse oxidativo pode causar danos estruturais a vários componentes celulares. Altamente reativas, as EROs podem afetar membranas, mitocôndrias, retículo endoplasmático, e causar alterações moleculares, como fragmentação do DNA e alteração estrutural de lipídeos, carboidratos e proteínas, com elevado impacto no *status* funcional dos espermatozoides (VERNET, AITKEN e DREVET, 2004; AITKEN e CURRY, 2011; SIMÕES, FEITOSA, *et al.*, 2013). Em relação aos danos moleculares, é importante considerar que as células espermáticas possuem grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) em suas membranas, classe lipídica facilmente

oxidada. Essa oxidação desencadeia a peroxidação lipídica e seu efeito em cascata, com a consequente geração de aldeídos lipídicos altamente reativos que se ligam às proteínas da cadeia de transporte de elétrons (CTE) reforçando a produção de EROs mitocondrial (AGARWAL, VIRK, *et al.*, 2014; GUALTIERI, KALTHUR, *et al.*, 2021). A peroxidação lipídica gera ainda subprodutos tóxicos, entre os quais se destaca o malondialdeído (MDA) (NICHI, GOOVAERTS, *et al.*, 2007; SARIÖZKAN, BUCAK, *et al.*, 2009; KUMAR, PRASAD, *et al.*, 2019). É importante levar em consideração ainda que espermatozoides são células silenciadas (transcricionalmente inativas), dependendo do maquinário proteico existente e sem capacidade de síntese de componentes para as suas membranas (AITKEN e DREVET, 2020). Por conseguinte, danos moleculares podem comprometer a ativação de várias vias funcionais necessárias para a fertilização (PEDDINTI, NANDURI, *et al.*, 2008; AGARWAL, VIRK, *et al.*, 2014; DE CASTRO, DE ASSIS, *et al.*, 2016), bem como afetar a composição das membranas plasmática e acrossomal e a sua reorganização durante os processos de capacitação e reação acrossomal, afetando a capacidade fecundante das células espermáticas (AMARAL, LOURENÇO, *et al.*, 2013; AGARWAL, VIRK, *et al.*, 2014; AITKEN, 2017; LOSANO, ANGRIMANI, *et al.*, 2018).

## **2.4 MEMBRANAS E FUNÇÃO ESPERMÁTICA**

Como em todas as células de mamíferos, a membrana plasmática do espermatozoide é composta por uma bicamada fosfolipídica com proteínas, glicoproteínas e glicolipídeos integrados, formando um mosaico fluido (GADELLA, 2008). Distintamente da maioria das células, no entanto, a membrana espermática tem uma composição que torna este mosaico mais dinâmico e possui diferentes composições de fosfolipídios em diferentes regiões do espermatozoide, bem como nos folhetos interno e externo, possuindo papel fundamental no processo de fertilização (LENZI, PICARDO, *et al.*, 1996; FLESH e GADELLA, 2000). É importante considerar, que o padrão lipídico do espermatozoide ejaculado só é definido após a maturação epididimária, com alterações no conteúdo de fosfolipídios e colesterol, e que, após a maturação, devido à perda da maior parte das organelas e da transcrição do DNA, o espermatozoide não possui a capacidade de nova síntese de lipídios e proteínas presentes em sua membrana (FLESH e GADELLA, 2000; WASSALL e STILLWELL, 2009; GADELLA, 2008).

Estudos sobre a composição lipídica e proteica da membrana espermática demonstram que a mesma pode estar relacionada com funções específicas por meio da criação de micro-domínios com características distintas quanto à fluidez, fusogenicidade e permeabilidade, as quais são necessárias para a fecundação do oócito (WASSALL e STILLWELL, 2009; MANDAL, BADIYAKAR e CHAKRABARTY, 2014). Os fosfolipídios compõem a maior fração lipídica da membrana da célula espermática. Nesta classe, os componentes mais importantes são fosfatidilcolinas (PC), fosfatidiletanolaminas (PE) e esfingomielinas (SM), os quais possuem ligações com diferentes combinações de ácidos graxos de vários comprimentos e saturação (LENZI, PICARDO, *et al.*, 1996; MARTÍNEZ-SOTO, LANDERAS e GADEA, 2013). Como já citado, a membrana espermática contém uma grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) que contribuem para a sua fluidez e flexibilidade (LENZI, PICARDO, *et al.*, 1996; MARTÍNEZ-SOTO, LANDERAS e GADEA, 2013; MANDAL, BADIYAKAR e CHAKRABARTY, 2014). É importante salientar que a composição lipídica da membrana espermática difere não apenas nas distintas regiões do espermatozoide, mas também em espécies e indivíduos com perfis de fertilidade distintos em uma mesma espécie (AKSOY, AKSOY, *et al.*, 2006; AM-IN, KIRKWOOD, *et al.*, 2011).

A membrana plasmática é uma estrutura com papel fundamental em diversos eventos fisiológicos do espermatozoide, culminando com o seu potencial fertilizante. A integridade e composição da mesma são cruciais para a preservação da homeostase celular, sobrevivência no trato reprodutivo da fêmea, processo de capacitação e, juntamente com a membrana acrossomal, na fecundação, interagindo com as células do complexo *cumulus oophorus* e zona pelúcida (FLESH e GADELLA, 2000; CELEGHINI, DE ARRUDA, *et al.*, 2007; HOSSAIN, JOHANNISSON, *et al.*, 2011). Da mesma forma, a integridade da membrana acrossomal e a manutenção das enzimas contidas no acrossoma, são essenciais para que a reação acrossomal ocorra e, conseqüentemente a fecundação (FLESH e GADELLA, 2000; BAILEY, BILODEAU e CORMIER, 2000).

Os espermatozoides não possuem habilidade fecundante após a ejaculação. *In vivo*, quando estes se aproximam da região de fecundação, eles se aderem a células epiteliais do oviduto, dando início aos processos de capacitação e hiperativação e, quando se ligam à zona pelúcida do oócito, passam pela reação acrossomal, necessária para a penetração no oócito e fecundação (BAILEY,

BILODEAU e CORMIER, 2000; JAGAN MOHANARAO e ATREJA, 2011). *In vitro*, estes processos são induzidos pelo uso de meios com diferentes agentes capacitantes (KARUNAKARAN e DEVANATHAN, 2017). Os processos de capacitação e reação acrossomal envolvem alterações morfológicas, bioquímicas e moleculares complexas, muitas já conhecidas, apesar de pouco ainda se saber sobre as vias de sinalização das mesmas (MURASE, EL-KON, *et al.*, 2010; NARESH e ATREJA, 2015; AITKEN, 2017).

Durante a capacitação, as espécies reativas de oxigênio (EROs) possuem um papel fisiológico importante, facilitando a remoção de colesterol da membrana plasmática, pela produção de oxisterol, aumentando a sua fluidez e permeabilidade ao cálcio (GADELLA, TSAI, *et al.*, 2008; KATO e NAGAO, 2015; BREITBART, 2002). A alteração da composição da membrana plasmática, com a presença de complexos receptores, é um processo essencial na capacitação (AITKEN, RYAN, *et al.*, 2004; AITKEN, 2017). Após a ligação do espermatozoide capacitado à zona pelúcida, ocorre a reação acrossomal, processo complexo com a ativação de uma cascata de proteínas quinase e ação de EROs, na qual a exocitose de enzimas é imprescindível para a penetração do espermatozoide no oócito (JAGAN MOHANARAO e ATREJA, 2011; LOSANO, ANGRIMANI, *et al.*, 2015; NARESH e ATREJA, 2015).

A cabeça do espermatozoide possui diferentes regiões com composições de membrana distintas e com funções específicas. Apenas na região em que a membrana plasmática cobre o acrossomo, há uma pequena área específica para a ligação com a zona pelúcida, uma área maior envolvida no processo de reação acrossomal e uma terceira área cuja função envolve a fusão das membranas do espermatozoide e oócito (GADELLA, TSAI, *et al.*, 2008). No entanto, os mecanismos e estruturas moleculares que atuam nesta redistribuição dinâmica, observada nas membranas espermáticas, não são bem compreendidos, bem como a composição lipídica das diferentes regiões ou micro-domínios envolvidos nos processos de capacitação, reação acrossomal, fusão com a zona pelúcida e fecundação (LENZI, PICARDO, *et al.*, 1996; ARGOV-ARGAMAN, MAHGREFTHE, *et al.*, 2013; AITKEN, 2017). Da mesma forma, ainda não foram demonstradas, em várias espécies, quais diferenças no perfil lipídico da membrana espermática podem estar relacionadas com alta e baixa fertilidade ou com maior ou menor suscetibilidade à criopreservação seminal.

A membrana plasmática é o principal alvo de danos durante o processo de criopreservação e pós-descongelamento das células espermáticas. Durante a congelamento, cristais de gelo se formam no meio extracelular, aumentando, portanto, a osmolaridade da água não congelada. Conseqüentemente, há evasão da água intracelular, com desidratação da célula e sua membrana. Durante a descongelamento das células, o processo se repete de forma inversa (BAILEY, MORRIE e CORMIER, 2003; GRAHAM e MOCÉ, 2005). O uso de crioprotetores é essencial para a sobrevivência das células durante a criopreservação, pois eles alteram a osmolaridade do meio, retardam a formação de cristais de gelo e podem atuar na própria membrana reduzindo algumas fases de transição de estado de gel para cristais de gelo (PETRUNKINA, 2007; LAYEK, MOHANTY, *et al.*, 2016). No entanto, muitos espermatozoides sofrem alteração na ultraestrutura de suas membranas plasmáticas em consequência ao estresse osmótico e mecânico pela alteração rápida do volume citoplasmático (BAILEY, MORRIE e CORMIER, 2003; KUMAR, PRASAD, *et al.*, 2019). Na temperatura de transição do processo de criopreservação, há uma alteração abrupta da fase de gel para cristal líquido nos fosfolipídios da membrana, o que pode ocasionar danos estruturais irreversíveis na arquitetura da membrana plasmática (JANUSKAUSKAS, JOHANNISSON e RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2003; GADELLA, 2008). Estes danos podem tornar a membrana mais frágil e afetar a sua propriedade de semi-permeabilidade, ocasionando efluxo de colesterol, influxo de cálcio, alterações que resultam em capacitação e reação acrossomal precoces, reduzindo a viabilidade do espermatozoide (MANDAL, BADYAKAR e CHAKRABARTY, 2014; KUMAR, PRASAD, *et al.*, 2019).

## 2.5 PERFIL LIPÍDICO

Como citado acima, a composição lipídica das membranas plasmática e acrossomal do espermatozoide é essencial para as características funcionais do mesmo e, alterações nessa composição estão, normalmente, relacionadas com suas necessidades fisiológicas. A heterogeneidade da membrana plasmática leva à formação de microdomínios com diferentes características de fluidez, fusogenicidade e permeabilidade (GADELLA, 2008). Além disso, há ainda distribuição assimétrica transmembrana, com diferentes classes lipídicas na bicamada (LENZI, PICARDO, *et al.*, 1996; MANDAL, BADYAKAR e CHAKRABARTY, 2014). Estas características

possuem papel fundamental para desencadear os processos que levam à fertilização do oócito (FLESH e GADELLA, 2000; SHAN, XU, *et al.*, 2021). Portanto, a composição lipídica da membrana plasmática de espermatozoides de diferentes espécies é foco constante de pesquisas no que diz respeito à motilidade, fertilidade, efeitos do processo de criopreservação e viabilidade em geral (FLESH e GADELLA, 2000; AKSOY, AKSOY, *et al.*, 2006; MARTÍNEZ-SOTO, LANDERAS e GADEA, 2013; GADELLA, 2008). É importante salientar, que o espermatozoide possui uma quantidade mínima de citosol, o que faz com que a sua membrana plasmática fique em contato direto com estruturas citoesqueléticas subjacentes, as quais são organizadas com elevada polaridade. Este fato pode explicar as diferentes composições em áreas distintas da cabeça do espermatozoide, bem como da peça intermediária e do flagelo (FLESH e GADELLA, 2000; GADELLA, TSAI, *et al.*, 2008; ARGOV-ARGAMAN, MAHGREFTHE, *et al.*, 2013).

A composição lipídica da membrana plasmática de espermatozoides já foi elucidada em várias espécies, incluindo bovinos, mas novos avanços para refinar este conhecimento são constantes com a evolução nas técnicas aplicadas para extração e identificação de moléculas. (CLEGG e FOOTE, 1973; LENZI, PICARDO, *et al.*, 1996; EVANS, DINH, *et al.*, 2020; SHAN, XU, *et al.*, 2021). Existe uma diversidade na composição lipídica da membrana de células espermáticas nas diferentes espécies de mamíferos, mas os estudos indicam que, de uma forma generalizada, pode-se afirmar que há cerca de 70% de fosfolipídios, 25% de lipídios neutros e 5% de glicolipídios (FLESH e GADELLA, 2000; AM-IN, KIRKWOOD, *et al.*, 2011).

Os glicolipídios são glicoconjugados que se encontram normalmente na camada externa e constituem uma classe importante de lipídios polares da membrana plasmática de espermatozoides. Além de atuar, na manutenção da estabilidade da membrana e interações com o meio extracelular, em espermatozoides, os mesmos atuam em alterações importantes da composição lipídica da membrana e permitem maior estabilidade na transição de fase em processos de resfriamento e criopreservação (PARKS e LYNCH, 1992). Na região da cabeça, os mesmos estão envolvidos na organização de microdomínios e a sua migração lateral está relacionada com eventos moleculares que precedem a capacitação espermática e reação acrossomal (PARKS e LYNCH, 1992; GADELLA, LOPES-CARDOZO, *et al.*, 1995; SHAN, XU, *et al.*, 2021).

Uma diferença importante entre as membranas espermáticas e outros tipos celulares é a presença de maior quantidade de lipídios neutros. Na classe de esteróis, o colesterol é o principal lipídio neutro em espermatozoides de todas as espécies, e a sua quantidade responde por variações observadas não apenas entre diferentes espécies, mas também em raças, indivíduos e até mesmo em diferentes ejaculados (PARKS e LYNCH, 1992; KEBER, ROZMAN e HORVAT, 2013). O colesterol possui função importante na manutenção da estabilidade da membrana, corrigindo alterações na organização da mesma ao ser inserido nos espaços intersticiais da bicamada lipídica, se posicionando próximo às caudas de ácidos graxos de fosfolipídios. Esta estabilidade é mantida, ou corrigida, sem alterar a fluidez e difusão lateral de lipídios e proteínas (LEAHY e GADELLA, 2015). Outra importante classe de lipídios neutros nas células espermáticas são os diacilgliceróis (DAGs), que atuam com mensageiros para ativação de enzimas e receptores (ALWARAWRAH, DAI e HUANG, 2012). Apesar de diferenças significativas na sua estrutura química, colesterol e DAGs possuem alguns efeitos similares na bicamada lipídica, como alteração de sua espessura (pela redução de volume por lipídio e difusão lateral de moléculas), e condensação das bicamadas de fosfolipídios (pela ação de sua composição molecular, com pequenos grupos de cabeças polares e grandes corpos hidrofóbicos) (ALWARAWRAH, DAI e HUANG, 2012). No entanto, estudos demonstram que o colesterol, além de estar presente em maior quantidade, é mais efetivo que os DAGs em suas ações na membrana espermática (AM-IN, KIRKWOOD, *et al.*, 2011; KEBER, ROZMAN e HORVAT, 2013; SHAN, XU, *et al.*, 2021).

Em relação à classe mais abundante de lipídios da membrana plasmática de espermatozoides, os fosfolipídios (PL), os mesmos podem ser classificados como glicerofosfolipídios (GPLs) e esfingomielinas (SM), dependendo se sua estrutura é composta de glicerol ou esfingosina (Sph), respectivamente. Além de ser a base primária de esfingolipídios, como a esfingomielina, as esfingosinas também atuam como moléculas de sinalização, se ligando a receptores proteicos e atuando em processos relacionados à reação acrossomal e apoptose, por exemplo (GUO, OU, *et al.*, 2014). Os glicerofosfolipídios, por sua vez, são divididos em diferentes subclasses, dependendo das diferentes moléculas ligadas ao glicerol. As mais comuns na membrana espermática são fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS) e fosfatidilinositol (CLEGG e FOOTE, 1973; PARKS e



LYNCH, 1992; LENZI, PICARDO, *et al.*, 1996). Essas diferentes classes de fosfolipídios são distribuídas de forma assimétrica na bicamada lipídica, com fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina no folheto interno da membrana, enquanto a fosfatidilcolina e esfingomiéline se localizam no folheto externo, assimetria que é mantida pela ação de translocases dependentes de ATP (FLESH e GADELLA, 2000; JANUSKAUSKAS, JOHANNISSON e RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2003). Este arranjo de fosfolipídios é essencial para a regulação da maturação, fisiologia e diferentes funções da célula espermática e, quando comprometido, afeta progressivamente a integridade da membrana plasmática (JANUSKAUSKAS, JOHANNISSON e RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2003; GADELLA, 2008). Além disso, a proporção entre PC e PE também constitui um mecanismo importante na regulação da integridade de membrana (SHAN, XU, *et al.*, 2021).

As fosfatidilcolinas estão entre os componentes mais abundantes e importantes da membrana, atuando ainda na prevenção de danos estruturais durante processos de refrigeração e congelação das células espermáticas (MANDAL, BADIYAKAR e CHAKRABARTY, 2014; SHAN, XU, *et al.*, 2021). As fosfatidilcolinas apresentam diferentes combinações de ácidos graxos, de vários comprimentos e saturação, ligados nas posições C-1 e C-2, como os ácidos docosahexaenoico (DHA), araquidônico, linoleico, oleico, esteárico, palmítico, palmitoleico, heptadecenoico e mirístico (LENZI, PICARDO, *et al.*, 1996; MARTÍNEZ-SOTO, LANDERAS e GADEA, 2013). Os ácidos graxos esterificados em fosfolipídios são classificados de acordo com a presença ou não de ligações duplas na estrutura da sua cadeia, como ácidos graxos saturados (sem ligações duplas), monoinsaturados (uma única ligação dupla) e poliinsaturados (PUFAs, com duas ou mais ligações duplas). Como já citado, espermatozoides possuem uma grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados em sua membrana, sendo que, na maioria das espécies de mamíferos a presença de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, como o DHA, pode chegar até a 60% do total (NASIRI, TOWHIDI e ZEINOALDINI, 2012). Além de contribuir para uma maior fluidez da membrana, a presença de certos PUFAs, como o DHA, está associada a maior motilidade espermática (WASSALL e STILLWELL, 2009; LOSANO, ANGRIMANI, *et al.*, 2018). O DHA atrai interesse especial nos estudos sobre ácidos graxos em células espermáticas por ser encontrado em grandes concentrações e possuir 22 carbonos e seis ligações duplas, sendo um dos mais longos e mais insaturados membros da

família ômega 3 (WASSALL e STILLWELL, 2009; MANDAL, BADIYAKAR e CHAKRABARTY, 2014). Mais comumente esterificado em fosfatidiletanolaminas e em quantidades menores em fosfatidilcolinas e outras classes lipídicas, o DHA torna o folheto interno da membrana mais dinâmico, fluído e permeável, além de tender a afastar esteróis, como o colesterol, formando microdomínios ricos em PUFA e pobres em colesterol (GADELLA, TSAI, *et al.*, 2008; EVANS, DINH, *et al.*, 2020). No entanto, apesar dos benefícios dos ácidos graxos de cadeia longa a várias características importantes do espermatozoide, os mesmos o tornam mais suscetíveis aos efeitos negativos da criopreservação e estresse oxidativo (NICHI, BOLS, *et al.*, 2006; LOSANO, ANGRIMANI, *et al.*, 2018; AITKEN e DREVET, 2020).

A hidrólise de fosfatidilcolina por ação de fosfolipases leva à formação de lisofosfatidilcolina (LPC) e um ácido graxo livre. Desta forma, as PCs podem servir como fonte de ácidos graxos livres utilizados no metabolismo oxidativo e produção de energia, com os mesmos sendo carregados por carnitinas para as mitocôndrias (GADELLA, 2008; ALIABADI, MEHRANJANI, *et al.*, 2012; EVANS, DINH, *et al.*, 2020). As lisofosfatidilcolinas são componentes comuns da membrana plasmática de espermatozoides e possuem funções importantes como mediadores, influenciando na motilidade e processos relacionados à hiperativação, capacitação, reação acrossomal (pela ação no aumento da concentração de cálcio), e fusão de membranas na fertilização (GADELLA, TSAI, *et al.*, 2008; LONGOBARDI, KOSIOR, *et al.*, 2020). Além de formadas pela ação de enzimas sobre as PCs, as lisofosfatidilcolinas também podem ser originadas pela ação de EROs (SHAN, XU, *et al.*, 2021). Na classe de lisofosfolípidios há ainda os mediadores originados pela hidrólise do fator ativador de plaquetas (PAF), potente sinalizador, originando liso-PAFs, as quais, por sua vez, servem de substrato para a produção *de novo* de PAFs (ROUDEBUSH, 2001; HAILAT, SANNI, *et al.*, 2021). Estudos demonstram que as liso-PAFs atuam na modulação da cadeia de ácidos graxos e influenciam o padrão cinético de espermatozoides, aumentando motilidade e linearidade (JARVI, ROBERTS, *et al.*, 1993; HAILAT, SANNI, *et al.*, 2021). Além disso, há evidências de que PAFs e liso-PAFs atuam como sinalizadores nos processos de capacitação e reação acrossomal (ODEH, DASCANIO, *et al.*, 2003; WU, GAO, *et al.*, 2020; HAILAT, SANNI, *et al.*, 2021).

Por fim, também abundantes nas membranas de células espermáticas, há as esfingomielinas, classe de lipídios de membrana complexos, compostos de

fosforilcolina, esfingosina e um grupo acilado, como um ácido graxo. Como as PCs, as esfingomielinas também possuem esterificação com ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, principalmente na região da cabeça dos espermatozoides (FURLAND, ORESTI, *et al.*, 2007; AHUMADA-GUTIERREZ, PEÑALVA, *et al.*, 2019). A afinidade de esfingomielinas e esfingosinas com o colesterol pode ser responsável pela formação de regiões de baixa densidade, bem como por alterações na distribuição de proteínas na membrana dos espermatozoides. Há estudos que demonstram a importância das SMs na distribuição de esteróis na membrana espermática, bem como a influência da interação dos mesmos no controle do processo de capacitação (CROSS, 2000; FURLAND, ORESTI, *et al.*, 2007; SHAN, XU, *et al.*, 2021). Os vários estudos aqui citados, realizados desde as primeiras análises do perfil lipídico, avaliando ainda a sua distribuição heterogênea em microdomínios e regiões distintas nas membranas plasmáticas e acrossomal, demonstram que os lipídios de diferentes classes são fundamentais para que o espermatozoide seja viável e cumpra a sua função de fertilizar o oócito.

## 2.6 PERFIL METABÓLICO

A metabolômica compreende a análise e estudo do perfil metabólico ou metaboloma de amostras biológicas, como fluídos, tecidos e células, abrangendo uma enorme quantidade de metabólitos de baixo peso molecular que são transformados durante o metabolismo, como lipídios, peptídeos, aminoácidos, ácidos orgânicos, ácidos nucleicos, vitaminas, alcaloides, entre outros (PATTI, YANES e G., 2012; D'OCCHIO, BARUSELLI e CAMPANILE, 2019). Produto final de processos celulares, os metabólitos são considerados como as últimas reações a arranjos e alterações biológicas relativas ao ambiente. Portanto, entre as ômicas, a metabolômica é considerada a mais próxima do fenótipo, dando forma ao mesmo pela integração de processos endógenos e exógenos (MEHRPARAVAR, MINAI-TEHRANI, *et al.*, 2019; D'OCCHIO, BARUSELLI e CAMPANILE, 2019). Desta forma, ela permite uma leitura funcional da bioquímica celular, sendo um excelente indicador de alterações em funções biológicas (PATTI, YANES e G., 2012; SELVAM, FINELLI, *et al.*, 2020). Apesar de ser uma das técnicas mais recentes, desenvolvida após a genômica, transcriptômica e proteômica, com os avanços nas técnicas de análise, como espectrometria de massas e espectroscopia de ressonância

magnética nuclear (NMR), por exemplo, milhares de metabólitos podem ser identificados a partir de quantidades mínimas de amostras. Esse avanço vem proporcionando uma maior compreensão da biologia celular, permitindo a descoberta de biomarcadores e o diagnóstico de diferentes condições fisiológicas e patológicas (PATTI, YANES e G., 2012; BIENIEK, DRABOVICH e LO, 2016; MEHRPARAVAR, MINAI-TEHRANI, *et al.*, 2019).

Desde que a palavra metaboloma foi cunhada, há cerca de 20 anos, vários estudos foram iniciados na área de reprodução, sendo instigados inicialmente na busca de avanços na área de fertilidade humana, com a aplicação subsequente em animais, como modelo ou na busca de respostas na área de produção animal (ENGEL, BAUMANN, *et al.*, 2019; SELVAM, FINELLI, *et al.*, 2020). O primeiro estudo de perfil metabólico em plasma seminal foi publicado em 1993 por Hamamah *et al.* (HAMAMAH, SEGUIN, *et al.*, 1993; KUMAR, PRASAD, *et al.*, 2019), enquanto o primeiro estudo de metabolômica de células espermáticas, que apresentam um maior desafio para preparação de amostras e extração de metabólitos, foi realizado apenas em 2015 por Paiva *et al.* (PAIVA, AMARAL, *et al.*, 2015; MEHRPARAVAR, MINAI-TEHRANI, *et al.*, 2019). No entanto, é importante salientar que neste intervalo, a metabolômica do plasma seminal foi estudada em diferentes condições, buscando correlações com anomalias espermáticas (ENGEL, BAUMANN, *et al.*, 2019; SHAN, XU, *et al.*, 2021).

Os estudos desenvolvidos até hoje, tanto com plasma seminal quanto com células espermáticas, ressaltam o papel importante de várias classes de metabólitos identificados. O perfil lipídico, descrito acima, constitui conhecimento essencial para a compreensão de um dos órgãos mais importantes do espermatozoide, a membrana plasmática. No entanto, pesquisas apontam ainda a importância da identificação e quantificação comparativa de outros metabólitos fundamentais na fisiologia do espermatozoide, como carnitinas, carboidratos e compostos conjugados, peptídeos, aminoácidos e derivados, ácidos orgânicos, nucleosídeos, nucleotídeos e derivados (D'OCCHIO, BARUSELLI e CAMPANILE, 2019; MENEZES, VELHO, *et al.*, 2019; MEMILI, MOURA e KAYA, 2020). O uso de metabolômica para avaliação de sêmen humano pré e pós-criopreservação mostra, por exemplo, alterações no metabolismo de açúcares associadas à redução de motilidade (FU, LIU, *et al.*, 2019; SELVAM, FINELLI, *et al.*, 2020). Estudos com a identificação de carnitinas associam a presença das mesmas com vias metabólicas,

pela de oxidação de ácidos graxos, modulação de concentrações de CoA e acetil-CoA e ações antioxidantes (AMARAL, LOURENÇO, *et al.*, 2013; PAIVA, AMARAL, *et al.*, 2015; MONGIOI, CALOGERO, *et al.*, 2016). Quanto aos aminoácidos, análises em amostras de homens astenozoospermicos, indicam a baixa presença de aminoácidos como triptofano e leucina (ZHAO, ZHANG, *et al.*, 2018), enquanto estudos com pacientes inférteis demonstram alterações na concentração de arginina, lisina, tirosina e prolina (ZHANG, HUANG, *et al.*, 2014). Vários estudos, em espécies distintas, relatam a presença diferencial de ácidos orgânicos em grupos com maior e menor fertilidade, associando os resultados ao papel importante destes no metabolismo energético, alterações na homeostase oxidativa, hiperativação e reação acrossomal precoces (MENEZES, VELHO, *et al.*, 2019; MEMILI, MOURA e KAYA, 2020). Há, por fim, estudos que analisam o papel da glicólise e da fosforilação oxidativa no metabolismo energético de espermatozoides por meio da identificação e quantificação de nucleosídeos, nucleotídeos e derivados, como adenosina, AMP, AMP cíclico, NAD, FAD, e FMN (PAIVA, AMARAL, *et al.*, 2015; MEHRPARAVAR, MINAI-TEHRANI, *et al.*, 2019).

Entre os animais de produção, os estudos de metaboloma com plasma seminal e espermatozoides realizados em bovinos são, apesar de recentes e com a maioria utilizando touros de raças leiteiras, os mais numerosos e abrangentes. Estes revelam, por exemplo, a prevalência de ácidos orgânicos, ácidos graxos e carnitinas em espermatozoides e a sua importância no metabolismo energético (MEMILI, MOURA e KAYA, 2020; YANG, WANG, *et al.*, 2020). As análises feitas com plasma seminal, por sua vez, apresentam um maior espectro de metabólitos e estabelecem correlações demonstrando o papel do plasma na modulação da viabilidade espermática e fertilidade (VELHO, MENEZES, *et al.*, 2018; MENEZES, VELHO, *et al.*, 2019). O estudo realizado por Kumar *et al.* (2015), por exemplo, associa a diferença de concentrações de ácido cítrico, leucina e isoleucina com o perfil de animais com alta e baixa fertilidade (KUMAR, KROETSCH, *et al.*, 2015). Outro estudo com plasma seminal, conduzido por Velho *et al.* (2018), demonstra que há mais frutose e menos ácido  $\alpha$ -cetoglutárico, ornitina e leucina em touros de raça Holandesa de alta fertilidade (VELHO, MENEZES, *et al.*, 2018). A relação entre o metaboloma do plasma seminal, células espermáticas, considerando a qualidade e viabilidade das mesmas, torna a metabolômica uma excelente ferramenta emergente para avaliação de perfis de fertilidade e presença de alterações

fisiológicas em humanos e animais. No entanto, em ambos os casos, há ainda necessidade de mais pesquisas com maior número amostral e histórico conhecido para validar a correlação entre os perfis metabólico, funcional e reprodutivo (BIENIEK, DRABOVICH e LO, 2016; ENGEL, BAUMANN, *et al.*, 2019; MEMILI, MOURA e KAYA, 2020).

## **2.7 BENEFÍCIOS DA AVALIAÇÃO ASSOCIADA DE DIFERENTES ATRIBUTOS ESPERMÁTICOS E PERFIS MOLECULARES**

A avaliação isolada de atributos espermáticos não é capaz de estimar o potencial de fecundação ou a maior ou menor suscetibilidade à criopreservação de amostras seminais, pois há uma série de mecanismos associados e interações entre estes atributos. No entanto, a associação de técnicas distintas para a avaliação de diferentes funções espermáticas e, as interações e correlações entre as mesmas, podem levar a uma previsão mais eficaz do desempenho reprodutivos de animais, bem como permitir uma análise molecular mais acurada das vias envolvidas na ativação e funcionalidade destes atributos (BREWIS, MORTON, *et al.*, 2000; AITKEN, 2006; CELEGHINI, DE ARRUDA, *et al.*, 2007; GLIOZZI, TURRI, *et al.*, 2017).

Pouco ainda se sabe sobre os eventos e mecanismos moleculares envolvidos no potencial de fertilização e na suscetibilidade aos efeitos da criopreservação do sêmen. Não obstante, sabe-se que existe uma variação individual, inclusive entre touros da mesma raça e criados nas mesmas condições, na resistência dos espermatozoides à criopreservação e no potencial de fertilidade. Uma maior compreensão desses mecanismos, especialmente com a análise de um número elevado de amostras individuais e de animais com histórico conhecido, é essencial para a obtenção de uma maior eficiência no uso de sêmen congelado em biotécnicas reprodutivas (HOLT, 2000; PEDDINTI, NANDURI, *et al.*, 2008; AGARWAL, VIRK, *et al.*, 2014; MEMILI, MOURA e KAYA, 2020).

Os avanços recentes em técnicas para avaliação de perfis metabólicos permitem uma melhor caracterização da estrutura e de vias funcionais relacionadas à capacidade fecundante dos espermatozoides (HO, LAM, *et al.*, 2003; GUENGERICH, 2011; D'OCCHIO, BARUSELLI e CAMPANILE, 2019; MENEZES, VELHO, *et al.*, 2019). Desta forma, a associação de testes funcionais e análises moleculares são essenciais para se compreender as vias fisiológicas das células

espermáticas que podem ser afetados pela criopreservação espermática, com efeitos no metabolismo energético e homeostase oxidativa, culminando com a redução do potencial de fertilidade. Além disso, tais técnicas permitem, por meio da identificação futura de painéis de biomarcadores, selecionar indivíduos com maior resistência ao processo de criopreservação e com padrões de fertilidade distintos (PEDDINTI, NANDURI, *et al.*, 2008; MOURA, KOC, *et al.*, 2006; DU PLESSIS, KASHOU, *et al.*, 2011; AM-IN, KIRKWOOD, *et al.*, 2011; PAIVA, AMARAL, *et al.*, 2015; WOOD, SCOGGIN, *et al.*, 2016; VELHO, MENEZES, *et al.*, 2018; MEMILI, MOURA e KAYA, 2020; SHAN, XU, *et al.*, 2021).

### **3. CAPÍTULO 1**

#### **ANÁLISE LIPIDÔMICA, METABOLÔMICA E DOS ATRIBUTOS ESPERMÁTICOS DE TOUROS COM TAXAS DE FERTILIDADE DISTINTAS**

Considerando a importância da identificação do padrão de fertilidade de touros antes que os mesmos sejam colocados em serviço, os experimentos do primeiro capítulo deste estudo avaliaram diferentes partidas de touros das raças Angus (*Bos taurus*) e Nelore (*Bos indicus*) com histórico conhecido de alta e baixa fertilidade quanto aos atributos espermáticos (Experimento 1.1) e perfil lipídico e metabólico (Experimento 1.2). A melhor compreensão de características funcionais e mecanismos moleculares envolvidos na redução do potencial de fertilidade seminal, bem como a correlação entre os mesmos, pode contribuir para a identificação de marcadores moleculares relacionados à fertilidade, permitindo, futuramente, a avaliação de touros antes que entrem em serviço e sejam utilizados em técnicas da reprodução.

#### **3.1 HIPÓTESE**

Existem diferenças na funcionalidade e *status* oxidativo, bem como no perfil lipídico e metabólico, dos espermatozoides de touros com diferentes taxas de fertilidade.

#### **3.2 OBJETIVOS**

- Avaliar a funcionalidade e *status* oxidativo de amostras seminais criopreservadas provenientes de touros Angus (*Bos taurus*) e Nelore (*Bos indicus*) com taxas de fertilidade distintas.
- Analisar e identificar diferenças nos perfis lipídico e metabólico de amostras seminais criopreservadas de touros Angus (*Bos taurus*) e Nelore (*Bos indicus*) com taxas de fertilidade distintas.

#### **3.3 EXPERIMENTO 1.1 - ANÁLISE DOS ATRIBUTOS ESPERMÁTICOS, FUNCIONALIDADE E STATUS OXIDATIVO, DE TOUROS COM TAXAS DE FERTILIDADE DISTINTAS**

Neste primeiro experimento foi realizada a avaliação, por meio de análises funcionais e de *status* oxidativo de amostras criopreservadas de sêmen de touros, oriundas de central de coleta de sêmen (CRV Lagoa), visando identificar diferenças entre os grupos quanto à fertilidade (Alta vs Baixa), raça (Angus vs Nelore) e interações entre estes fatores. O primeiro experimento é apresentado abaixo em formato de artigo, sendo a tradução do mesmo, já publicado (Anexo 1).



## ARTIGO: FUNÇÃO ESPERMÁTICA E STATUS OXIDATIVO: IMPACTO NA FERTILIDADE DE TOUROS *BOS TAURUS* E *BOS INDICUS* EM PROGRAMAS DE IATF

### RESUMO

A avaliação da qualidade seminal é um dos critérios utilizados para a identificação e seleção de touros com maior fertilidade. No entanto, esta avaliação ainda constitui um desafio, já que a qualidade seminal sofre influência de muitas variáveis e a fertilidade depende da integridade e função de todas as estruturas que fazem parte da célula espermática. Portanto, o objetivo deste estudo foi associar técnicas convencionais e funcionais para avaliar amostras espermáticas de touros *Bos taurus* (raça Angus) e *Bos indicus* (raça Nelore) com histórico de fertilidade conhecido em programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). O estudo foi delineado como um arranjo fatorial 2x2, com um fator sendo a raça (Angus vs Nelore) e o outro a fertilidade (alta vs baixa). Os grupos de alta fertilidade são compostos por 10 touros Angus e 11 Nelore, e os de baixa fertilidade por 10 touros Angus e sete da raça Nelore. Foram analisadas amostras de quatro partidas distintas de cada animal ( $n=152$ ) quanto à morfologia, cinética espermática, integridade das membranas plasmática e acrossomal, atividade mitocondrial e potencial de membrana mitocondrial, integridade do DNA e *status* oxidativo. Não foram encontradas diferenças nas características analisadas usualmente nas análises convencionais. No entanto, as análises funcionais demonstraram uma importante relação entre alterações mitocondriais, *status* oxidativo e danos às estruturas espermáticas em touros de baixa fertilidade. Por outro lado, os resultados observados nos animais dos grupos de alta fertilidade, indicam uma maior preservação de estruturas dos espermatozoides. A associação entre técnicas utilizada neste estudo demonstra a importância da avaliação e correlação entre as diferentes funções espermáticas para uma melhor compreensão do impacto de diferentes parâmetros no potencial de fertilização de touros.

**Palavras-chave:** análises funcionais, *status* oxidativo, biotécnicas reprodutivas, inseminação artificial.

### 3.3.1 INTRODUÇÃO

Biotécnicas aplicadas à pecuária estão cada dia mais presentes no rebanho bovino brasileiro, visando o incremento das taxas reprodutivas e, conseqüentemente, produtivas dos animais. Entre elas, a inseminação artificial (IA), seja com observação de cio ou em tempo fixo (IATF), traz inúmeras vantagens, pois permite melhor aproveitamento de animais de elevado mérito genético, maior eficiência em programas de melhoramento genético, facilita a organização dos manejos e, portanto, ganhos de eficiência reprodutiva (LONERGAN, 2007; HALL, HINRICHS, *et al.*, 2013). Estas biotécnicas são fortemente influenciadas pelo efeito do macho e observa-se, a campo, touros que apresentam taxas de fertilidade reduzidas, mesmo com características espermáticas dentro dos padrões recomendados.

O uso de sêmen de touros de baixa fertilidade, utilizado para monta natural, IA e IATF, impacta diretamente a taxa de concepção de rebanhos. Neste contexto, é importante salientar, que a subfertilidade de um touro, tem um impacto muito maior do que a subfertilidade da fêmea, já que o primeiro resulta em um número elevado de vacas vazias, pode causar atrasos em partos, desmame, redução no peso de bezerros e, conseqüentemente, em uma queda significativa da taxa reprodutiva e produtiva do rebanho (KASTELIC e THUNDATHIL, 2008). A redução na fertilidade de um touro pode ser afetada por diferentes fatores, como manejo, estresse, genética e, em biotécnicas reprodutivas, no processo de criopreservação seminal (BAILEY, BILODEAU e CORMIER, 2000; AITKEN, 2006; AITKEN e BAKER, 2013).

Um aspecto importante que pode influenciar significativamente a fertilidade de um determinado touro é a origem genética. Touros *Bos taurus* possuem maior precocidade sexual, ganho de peso, melhor acabamento de carcaça e maior produção leiteira. Por outro lado, touros *Bos indicus* têm maior adaptação ao clima tropical, mais resistência a endo e ectoparasitas e maior habilidade materna. Desta forma, o cruzamento industrial, entre raças destas subespécies, se tornou desejável e muito utilizado para promover ganho genético e incremento na eficiência produtiva em seus descendentes (RESTLE, PASCOAL, *et al.*, 2002; TRAORÉ, MARKEMANN, *et al.*, 2017). No entanto, tais ganhos genéticos podem ser impactados negativamente pela redução da qualidade espermática e fertilidade de touros de raças europeias (*Bos taurus*) em regiões de clima quente devido à maior

suscetibilidade dos mesmos ao estresse térmico (NACHI, BOLS, *et al.*, 2006; SLIMEN, NAJAR, *et al.*, 2016; SABÉS-ALSINA, LUNDEHEIM, *et al.*, 2019). Há ainda observações frequentes de touros que apresentam alta qualidade espermática no sêmen ejaculado, mas que possuem uma perda bastante pronunciada tanto da qualidade espermática como da fertilidade quando submetidos à criopreservação do sêmen (HOLT, 2000; LAYEK, MOHANTY, *et al.*, 2016; CELEGHINI, ARRUDA, *et al.*, 2017). Como a criopreservação é um processo fundamental para a logística e aplicação de IA e IATF há ainda a necessidade de mais estudos visando melhorar o processo, especialmente levando em consideração o status funcional dos espermatozoides (BAILEY, BILODEAU e CORMIER, 2000; WATSON, 2000; O'CONNELL, MCCLURE e LEWIS, 2002; LOSANO, ANGRIMANI, *et al.*, 2018).

A avaliação da qualidade seminal é um dos critérios utilizados para a identificação e seleção de touros com maior fertilidade. Durante muitos anos, a avaliação da qualidade espermática levava em conta apenas o exame convencional constituído pela análise de motilidade, vigor, concentração e morfologia (BARTH e OKO, 1989; AITKEN, 2006; KIZILAY e ALTAY, 2017). Esta abordagem ainda é de extrema importância pela praticidade permitindo a identificação de amostras de baixa qualidade. No entanto, as células espermáticas são altamente especializadas e dotadas de diferentes características específicas que permitem que as mesmas sejam capazes de realizar a sua função de fecundar o oócito (GRAHAM e MOCÉ, 2005; AITKEN, 2006; MORRELL, NONGBUA, *et al.*, 2017). A análise convencional do sêmen não é suficiente para prever a capacidade fecundante de uma determinada amostra seminal e, como há vários fatores que podem afetar a fertilidade, há necessidade da aplicação de técnicas mais eficientes. Atualmente, a avaliação da qualidade espermática pode empregar técnicas mais avançadas, tais como a análise computadorizada da cinética espermática (CASA), uso de sondas fluorescentes associadas à citometria de fluxo, além de técnicas bioquímicas desenvolvidas para análises mais específicas de atributos espermáticos (GRAHAM, 2001; NACHI, GOOVAERTS, *et al.*, 2007; LOSANO, ANGRIMANI, *et al.*, 2015; GLIOZZI, TURRI, *et al.*, 2017). Estas técnicas permitem análises mais minuciosas da integridade e funcionalidade das estruturas celulares, entretanto, há poucos estudos que correlacionam estas análises com padrão de fertilidade (EVENSON e JOST, 2000; AITKEN, 2006; ALVES, ARRUDA, *et al.*, 2017).

A relação entre qualidade seminal e fertilidade é um dos pontos fundamentais no sistema de produção, e essa qualidade depende da integridade e função de todas as estruturas que fazem parte da célula espermática (CELEGHINI, ARRUDA, *et al.*, 2017). A avaliação isolada de características espermáticas ainda não é capaz de estimar o potencial de fecundação. No entanto, a associação de diferentes técnicas para a avaliação de funções espermáticas distintas e as interações e correlações entre as mesmas pode permitir o desenvolvimento de métodos mais precisos para a identificação de reprodutores com maior qualidade espermática e fertilidade (HOLT, 2000; PEDDINTI, NANDURI, *et al.*, 2008; AITKEN, 2006; ALVES, ARRUDA, *et al.*, 2017). Portanto, o objetivo deste estudo foi associar técnicas convencionais e funcionais para avaliar vários atributos espermáticos de amostras seminais de touros com histórico reprodutivo conhecido e com diferentes padrões de fertilidade em programas de IATF.

### **3.3.2 MATERIAL E MÉTODOS**

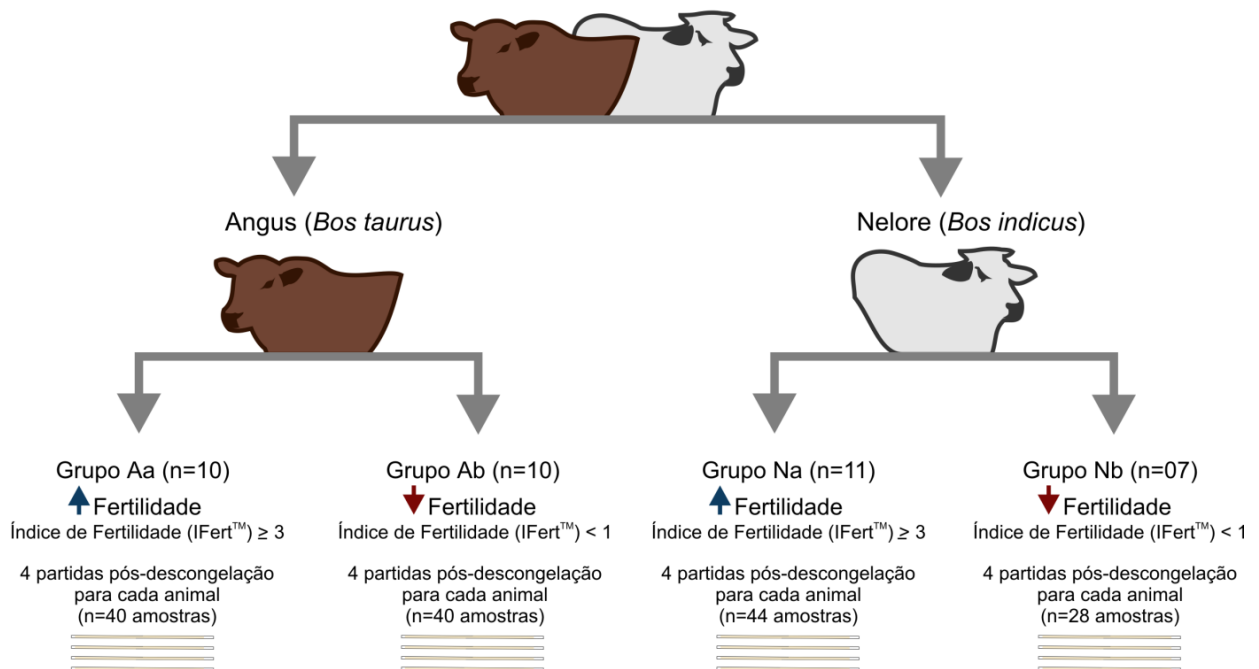
Este estudo foi conduzido de acordo com as normas éticas para o uso de animais e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (protocolo nº 2054100717). A menos que indicado, os reagentes utilizados neste estudo foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, E.U.A.).

#### **3.3.2.1 Delineamento Experimental**

As amostras analisadas consistem em partidas de sêmen congeladas oriundas de central de coleta de sêmen (CRV Lagoa). Todo o processo de coleta e criopreservação foi realizado pela central, seguindo o mesmo protocolo, com sêmen de touros em idade reprodutiva (4 a 8 anos). Foram utilizadas amostras criopreservadas de touros Angus (*Bos taurus*) e Nelore (*Bos indicus*), com histórico de fertilidade conhecido, determinado por meio do índice IFert™. O IFert™, atualizado anualmente, mostra a diferença, em pontos percentuais, na taxa de concepção do reprodutor frente à média da base de dados avaliada. Esta base de dados, que contém mais de 170.000 IATFs e contempla 543 reprodutores, é avaliada por meio de filtros algoritmos onde fatores ligados aos lotes são isolados, a fim de avaliar apenas o “fator touro” dentro do resultado da IATF (CRV LAGOA,

2018). De acordo com a análise realizada em 2018 pelo IFert™, animais com índice maior ou igual a três possuem taxa de fertilidade superior e foram enquadrados, no presente estudo, no grupo de alta fertilidade, enquanto os animais com índice abaixo de um foram enquadrados no grupo de baixa fertilidade. O grupo de alta fertilidade é composto por 10 touros da raça Angus (Aa) e 11 touros da raça Nelore (Na), enquanto o grupo de baixa fertilidade é composto por 10 touros Angus (Ab) e sete touros Nelore (Nb) (Figura 1). Quatro partidas distintas de cada touro foram utilizadas em todas as análises, constituindo a unidade experimental e compondo um total de 152 amostras (Aa:  $n=40$ ; Na:  $n=44$ ; Ab:  $n=40$ ; Nb:  $n=28$ ). Os resultados das análises foram submetidos a um arranjo fatorial 2x2, onde um dos fatores é a taxa de fertilidade (alta e baixa) e o outro fator é constituído de raça (Angus e Nelore).

Figura 1 - Delineamento experimental do Capítulo I  
**Fertilidade**



Fonte: Leite (2022)

Os grupos são apresentados como Angus de Alta (Aa), Angus de Baixa (Ab), Nelore de Alta (Na) e Nelore de Baixa (Nb). Os animais com índice maior ou igual a três pertencem ao grupo de alta fertilidade, enquanto animais com índice abaixo de um pertencem ao grupo de baixa fertilidade.

### 3.3.2.2 Análises Espermáticas

As palhetas de sêmen foram transportadas (da central para o laboratório) e mantidas em nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises. No momento

das análises espermáticas, as palhetas foram descongeladas por 30 segundos a 37°C em microtubo de 1,5 mL, mantido em banho-seco a 37°C. As análises funcionais foram validadas com pelo menos três replicatas técnicas de cada grupo estudado (Aa, Ab, Na e Nb) antes da avaliação das replicatas biológicas.

### **3.3.2.2.1 Análise de morfologia espermática**

A morfologia espermática foi analisada em amostras fixadas em solução formol salina (5% formol em tampão fosfato-salino - PBS) por meio de câmara úmida utilizando microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC, Nikon® Eclipse TE300, Japão) em ampliação de 1250x. Foram examinados, em campos aleatórios, 200 espermatozoides por amostra e os defeitos classificados de acordo com Barth e Oko, 1989, em maiores (maior impacto na fertilidade e condições patológicas) e menores (menor impacto na fertilidade), com a soma dos dois sendo classificada como defeitos totais (BARTH e OKO, 1989).

### **3.3.2.2.2 Análise computadorizada da cinética espermática**

A cinética espermática foi avaliada pelo sistema CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis; Hamilton-Thorne®, Ivos 12.3, E.U.A.), utilizando o *setup* para touros do equipamento (GOOVAERTS, HOFLACK, *et al.*, 2006). De forma sucinta, a aquisição de imagem foi em 60 Hz frames/s com mínimo de 80 espermatozoides por campo, cinco pixels como tamanho mínimo e 70 para intensidade das células, velocidade de 50  $\mu\text{m/s}$ , 70% de retilinearidade (STR) para células progressivas e valor de corte para células lentas de 30 e 15  $\mu\text{m/s}$  para velocidade média de percurso (VAP) e velocidade retilínea (VSL), respectivamente. Uma alíquota (3  $\mu\text{L}$ ) de cada amostra foi inserida em câmaras de contagem Leja (Leja Products B.V, Holanda), mantidas a 37°C, com a análise de pelo menos 1000 células em no mínimo seis campos por amostra. Foram avaliadas motilidade total (%) e progressiva (%), velocidade média de percurso (VAP, em  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade retilínea (VSL, em  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade curvilínea (VCL, em  $\mu\text{m/s}$ ), amplitude do movimento lateral da cabeça (ALH, em  $\mu\text{m}$ ), frequência de batimento cruzado (BCF, em Hz), retilinearidade (STR, VSL/VAP, em %) e linearidade (LIN, VSL/VCL, em %). Além disso, as amostras foram subdivididas quanto às suas velocidades em rápidas (%), médias (%), lentas (%) e estáticas (%).

### 3.3.2.2.3 Análise funcional por técnicas de citometria de fluxo e citoquímica

Atributos funcionais das amostras espermáticas foram avaliados por meio da técnica de citometria de fluxo (Guava EasyCyte™ Mini System, Guava® Technologies, E.U.A.), de acordo com Castro et al. (DE CASTRO, DE ASSIS, *et al.*, 2016). Para esta técnica, a concentração de todas as amostras foi fixada em  $25 \times 10^6$  espermatozoides/mL após diluição em meio TL-sêmen (PARRISH, SUSKO-PARRISH, *et al.*, 1988). As análises foram realizadas no software FlowJo® v10.2 (BD, Oregon, E.U.A.), considerando-se pelo menos 10 mil eventos por amostra

A análise de integridade das membranas plasmática e acrossomal foi realizada por meio das sondas fluorescentes iodeto de propídeo (IP) e FITC (isotiocianato de fluoresceína) conjugada à aglutinina *Pisum sativum* (FITC-PSA), respectivamente. As amostras foram marcadas com 0,5 mg/mL de IP e 100 mg/mL de FITC-PSA e analisadas em citômetro de fluxo após 10 min de incubação sob excitação de 488 nm e emissão de 630-650 nm para a sonda IP e 515-530 nm para a sonda FITC. O IP se liga ao DNA e emite fluorescência vermelha quando a membrana plasmática está lesionada, enquanto o FITC-PSA se liga às glicoproteínas da membrana acrossomal externa, emitindo fluorescência verde quando o acrossoma está lesionado.

A análise de suscetibilidade do DNA à denaturação *in situ* induzida por meio ácido foi feita pelo ensaio da estrutura da cromatina espermática seguindo protocolo adaptado do ensaio SCSA® descrito por Evenson e Jost (EVENSON e JOST, 2000). As amostras foram incubadas com 50 µL de *buffer* TNE (Tris-HCl 0,01 M, NaCl 0,15 M, EDTA 1 mM em água destilada, pH 7,4) e 100 µL de detergente ácido (HCl 0,08 M, NaCl 0,15 M, Triton X-100 0,1% em água destilada, pH 1,2) por 30 segundos. Em seguida, foi feita a adição de 100 µL de sonda laranja de acridina (LA), conforme descrito por Castro et al. (DE CASTRO, DE ASSIS, *et al.*, 2016). Cada amostra foi analisada por citometria de fluxo após incubação a 37°C por 5 min, sob excitação de 488 nm e emissão de 630-650 nm (vermelho) e 515-530 nm (verde).

O potencial de membrana mitocondrial (i.e., o gradiente eletroquímico oriundo da capacidade mitocondrial de bombear prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas) foi avaliado por meio da sonda fluorescente carbocianina JC-1 (Iodeto de 5,5',6,6' tetracloro 1,1,3,3' tetraetilbenzimidazolilcarbocianina; Invitrogen, Oregon, E.U.A.). Foram adicionados 0,5 µL de JC-1 (76,5 mM) às amostras com incubação a 37°C por 5 min antes da análise no citômetro sob

excitação de 488 nm e detecção a 590 nm. As amostras foram classificadas de acordo com a fluorescência emitida em porcentagens de espermatozoides com potencial de membrana mitocondrial baixo (verde), intermediário ou médio (laranja), e alto (vermelho).

A atividade mitocondrial (i.e., a eficiência de transporte de elétrons entre os complexos enzimáticos na membrana mitocondrial interna) foi analisada pela técnica citotóxica utilizando o reagente 3,3 diaminobenzidina (Teste DAB). Nessa técnica, a diaminobenzidina é oxidada pela enzima Citocromo C-Oxidase de mitocôndrias ativas, formando um complexo de coloração marrom (HRUDKA, 1987). Alíquotas de 20 µL das amostras foram incubadas com 20 µL de DAB (concentração final de 0,5 mg/mL) em microtubos âmbar durante 1 hora em banho-maria a 37°C. Após a incubação, foi feito esfregaço em lâminas de microscopia em local protegido da luz e secagem em ar ambiente. Posteriormente, as lâminas foram fixadas em formaldeído 10% durante 15 min. A leitura das lâminas foi realizada em microscopia com contraste de fase em magnificação de 1000x sob óleo de imersão. Em cada amostra, 200 células foram contadas e classificadas em quatro classes de acordo com a porcentagem de mitocôndrias coradas: alta atividade mitocondrial (100%, Classe I), média (mais que 50%, Classe II), baixa (menos que 50%, Classe III) e ausência de atividade mitocondrial (ausência de coloração, Classe IV). As classes distintas foram utilizadas para a obtenção do índice de atividade mitocondrial (IAM), o qual é calculado pela adição dos produtos do número de células de cada classe pelo seu *score*, como demonstrado na equação abaixo (HRUDKA, 1987):

$$IAM = \frac{(Classe I \times 1) + (Classe II \times 0,5) + (Classe III \times 0,25) + (Classe IV \times 0)}{\text{número de células classificadas}} \times 100$$

#### **3.3.2.2.4 Avaliação do status oxidativo**

A avaliação das amostras quanto à suscetibilidade à peroxidação lipídica foi realizada por análise bioquímica pelo Ensaio TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*), desenvolvido por Ohkawa et al. (OHKAWA, OHISHI e K., 1979) e adaptado por Nichi et al. (NICHI, BOLS, et al., 2006). Uma alíquota de 200 µL de cada amostra foi lavada duas vezes em 1,6 mL de PBS por meio de centrifugação a 1100g por 10 min a 37°C. O sobrenadante de PBS foi removido e a lipoperoxidação das amostras foi induzida pela incubação de 200 µL de amostra com 50 µL de ácido ascórbico (20 mM) e 50 µL de sulfato de ferro (4 mM) a 37°C durante 90 min. Após a



indução, foram adicionados 600 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% a 5°C e foi feita a centrifugação a 20800g durante 15 min a 5°C para promover a precipitação de proteínas e células. O sobrenadante (800 µL) foi recuperado, transferido para criotubos e incubados com 800 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 1% em banho-maria a 95°C durante 15 min, para a reação de moléculas de malondialdeído (MDA) com o TBA. Em seguida, os criotubos foram imersos em gelo para interrupção imediata da reação. O TBA reage com o MDA, principal produto da peroxidação lipídica da membrana espermática, produzindo uma solução de coloração rósea. Essa coloração foi quantificada em espectrofotômetro (Ultrospec 3300 pro®, Amersham Biosciences, Chicago, E.U.A.) com comprimento de onda de 532 nm. Desta forma, a avaliação da suscetibilidade à peroxidação lipídica é calculada de acordo com a concentração espermática de cada amostra e expressa em ng de MDA/10<sup>6</sup> espermatozoides (NICHI, BOLS, *et al.*, 2006).

A detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs) das amostras foi realizada por meio da sonda fluorescente CellRox® green (Molecular Probes, E.U.A.) pela técnica de citometria de fluxo, conforme descrito no item 3.3.2.2.3 (DE CASTRO, DE ASSIS, *et al.*, 2016). A sonda fluorescente penetra na célula e, quando oxidada por EROs intracelulares emite uma intensa fluorescência verde. As amostras foram incubadas com a sonda em uma concentração de 5 µM, a 37°C durante 30 min e, 10 min antes de deste tempo ser completado, foi adicionada a sonda IP a uma concentração final de 6 µM. A leitura foi realizada com excitação a 488 nm e detecção a 515-530 nm para a sonda CellRox® green e 630-650 nm para a sonda IP. Para a análise dos dados, foram selecionadas as populações de células com membrana plasmática íntegra e com alta detecção de EROs (IP- e CellROX+).

#### **3.3.2.2.5 Análise Estatística**

Os dados obtidos foram analisados no programa do SAS System for Windows (SAS Institute Inc., NC, E.U.A.) e testados para normalidade de resíduos e homogeneidade das variâncias usando o aplicativo *SAS Guided Data Analysis*. Variáveis que não seguiram essas premissas foram transformadas (log e raiz quadrada), com a normalidade de resíduos sendo obtida e as mesmas analisadas, portanto, por método paramétrico. Por se tratar de delineamento fatorial 2x2, os efeitos de fertilidade (Alta vs Baixa) e raça (Angus vs Nelore), bem como as interações entre estes fatores, foram determinados por PROC GLM (*general linear*

*models*: método de mínimos quadrados para modelos lineares em geral). Variáveis que apresentaram interação foram analisadas para o efeito da fertilidade em cada raça (teste T utilizando seleção fertilidade por raça; comparando Aa com Ab e Na com Nb) e para o efeito da raça em cada grupo de fertilidade (teste T utilizando seleção raça por fertilidade; comparando Aa com Na e Ab com Nb). As variáveis que não apresentaram interação significativa foram analisadas isoladamente quanto à fertilidade e raça (comparando alta com baixa fertilidade e Angus com Nelore). O nível de significância usado para rejeitar H0 (hipótese de nulidade) foi de 5%. A análise de correlação foi feita utilizando os dados não transformados, classificados por grupo (Aa, Na, Ab, Nb) pelo teste de Spearman, com ranqueamento dos resultados.

Os dados foram ainda submetidos à análise de componentes principais (PCA) e discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA), no sistema R do MetaboAnalyst 5.0 (XIA e WISHART, 2016; PANG, CHONG, *et al.*, 2021) e pelo programa Past 4.0 (HAMMER, HARPER e AND RYAN, 2001). Antes de submetidos às análises os dados foram normalizados com transformação por log e escala centralizada pela média. As análises de PCA e PLS-DA foram utilizadas para verificação de diferenças globais entre os grupos e identificação de variáveis com maior contribuição significativa. Os resultados são apresentados em gráficos de PCA *biplot* (amostras e variáveis). Os grupos analisados são apresentados em *clusters* de amostras circundados por elipses de intervalo de confiança de 95% (IC), enquanto as variáveis são apresentadas com escala *eigenvalue*, a qual indica importância e influência das principais variáveis nos grupos analisados. A seleção de variáveis considerou valores de *loadings* (PCA) e *VIP score* (Variáveis Importantes em Projeção – obtido pela análise de PLS-DA). *Loadings* maiores (positivos ou negativos) indicam que uma variável tem um forte efeito naquele componente principal, enquanto valores positivos e negativos indicam que uma variável e um componente principal estão positivamente ou inversamente correlacionados, respectivamente. As tabelas com os valores de *loadings* estão disponíveis no Apêndice 2.

### 3.3.3 RESULTADOS

Foi possível observar interação entre fertilidade e raça (fertilidade\*raça) em muitas das variáveis analisadas, como morfologia e cinética espermáticas, atividade e potencial de membrana mitocondriais, *status* oxidativo e suscetibilidade a danos do DNA (Tabela 1). A presença de interação para uma determinada variável indica que os grupos de fertilidade se comportam de forma diferente dentro de cada grupo genético e/ou que grupos genéticos se comportam de forma distinta em cada grupo de fertilidade (Tabelas 2 e 3). Há, ainda, variáveis que apresentaram diferença sem interação, as quais são divididas em efeito fertilidade e efeito raça (Tabelas 4 e 5). Vale salientar que, mesmo avaliando quatro partidas distintas de cada animal, não houve diferença na concentração espermática entre os grupos (em milhões de células/mL; Alta:  $82,18 \pm 2,13$ ; Baixa:  $82,34 \pm 2,27$ ; Angus:  $80,88 \pm 2,09$ ; Nelore:  $83,78 \pm 2,30$ ), o que indica que o número de células não teve influência nas demais análises realizadas. Os resultados são apresentados por análise, compreendendo variáveis com e sem interação. Nos dados com interação os grupos são apresentados como Angus de Alta (Aa), Angus de Baixa (Ab), Nelore de Alta (Na) e Nelore de Baixa (Nb), enquanto que nos resultados sem interação os grupos são identificados como alta e baixa fertilidade e raças, Angus e Nelore. Como as variáveis são paramétricas, os resultados são apresentados nas tabelas em médias (não transformadas)  $\pm$  erro padrão da média (SEM), bem como em gráficos *boxplot* com média, mediana, espaço interquartis, limites máximo e mínimo e valor de *P*.

Tabela 1 - Resultados da análise de interação de fertilidade (alta vs baixa) e raça (Angus vs Nelore) de atributos espermáticos de amostras de sêmen criopreservado

VARIÁVEL	INTERAÇÃO (VALOR DE P)		
	RAÇA	FERTILIDADE	RAÇA*FERTILIDADE
Concentração espermática ( $\times 10^6$ /mL)	0,3165	0,8414	0,5627
Defeitos maiores (%)	<,0001	<,0001	<b>0,0348</b>
Defeitos menores (%)	0,0004	<,0001	<b>0,0121</b>
Defeitos totais (%)	0,0133	<,0001	0,7077
Motilidade total (%)	0,0756	0,3318	0,1928
Motilidade progressiva (%)	0,1613	0,2245	0,9539
VAP - Velocidade média ( $\mu$ m/s)	<,0001	0,8647	0,4478
VSL - Velocidade linear ( $\mu$ m/s)	<,0001	0,3582	0,8096
VCL - Velocidade curvilínea ( $\mu$ m/s)	<,0001	0,2359	0,1800
ALH - Amplitude do movimento lateral da cabeça ( $\mu$ m)	0,0023	0,0392	<b>0,0094</b>
BCF - Frequência de batimento cruzado (Hz)	0,9715	0,4134	<b>0,0098</b>
STR - Retilinearidade (%)	0,2251	0,0271	0,1549
LIN - Linearidade (%)	0,3167	0,0082	<b>0,0434</b>

VARIÁVEL	INTERAÇÃO (VALOR DE P)		
	RAÇA	FERTILIDADE	RAÇA*FERTILIDADE
Concentração espermática ( $\times 10^6$ /mL)	0,3165	0,8414	0,5627
Defeitos maiores (%)	<,0001	<,0001	<b>0,0348</b>
Defeitos menores (%)	0,0004	<,0001	<b>0,0121</b>
Defeitos totais (%)	0,0133	<,0001	0,7077
Motilidade total (%)	0,0756	0,3318	0,1928
Motilidade progressiva (%)	0,1613	0,2245	0,9539
VAP - Velocidade média ( $\mu$ m/s)	<,0001	0,8647	0,4478
VSL - Velocidade linear ( $\mu$ m/s)	<,0001	0,3582	0,8096
VCL - Velocidade curvilínea ( $\mu$ m/s)	<,0001	0,2359	0,1800
ALH - Amplitude do movimento lateral da cabeça ( $\mu$ m)	0,0023	0,0392	<b>0,0094</b>
BCF - Frequência de batimento cruzado (Hz)	0,9715	0,4134	<b>0,0098</b>
STR - Retilinearidade (%)	0,2251	0,0271	0,1549
Velocidade rápida (%)	0,7230	0,6112	<b>0,0932</b>
Velocidade média (%)	<,0001	0,5227	0,4265
Velocidade lenta (%)	0,5786	0,9419	0,1338
Estáticos (%)	0,0012	0,2494	<b>0,0050</b>
Atividade mitocondrial alta - DAB Classe I (%)	<,0001	0,6981	<b>0,0637</b>
Atividade mitocondrial média - DAB Classe II (%)	<,0001	0,4406	<b>0,0021</b>
Atividade mitocondrial baixa - DAB Classe III (%)	0,4657	0,0959	<b>0,0959</b>
Ausência de atividade mitocondrial - DAB Classe IV (%)	0,0004	0,0220	<b>0,0937</b>
Índice de atividade mitocondrial (%)	<,0001	0,4884	<b>0,0719</b>
Potencial de membrana mitocondrial baixo (%)	0,2918	<,0001	<b>&lt;,0001</b>
Potencial de membrana mitocondrial médio (%)	0,0066	<,0001	<b>0,0426</b>
Potencial de membrana mitocondrial alto (%)	<,0001	<,0001	<b>&lt;,0001</b>
Integridade de membrana acrossomal (%)	0,0002	0,9199	<b>0,0861</b>
Integridade de membrana plasmática (%)	0,0042	0,0073	0,3422
Presença de EROs e membrana Íntegra (%)	<,0001	0,2510	<b>0,0742</b>
TBARS (ng de MDA/ $10^6$ espermatozoides)	<,0001	0,0944	<b>&lt;,0001</b>
Suscetibilidade a danos de DNA (%)	<,0001	<,0001	<b>&lt;,0001</b>

Fonte: Leite (2022)

Valores de  $P < 0,1$  foram considerados como interação entre os fatores e são apresentados em vermelho.

Tabela 2 - Efeito do grupo genético (Angus e Nelore) sobre a fertilidade (alta e baixa) de atributos espermáticos de amostras de sêmen criopreservado

VARIÁVEL	ALTA FERTILIDADE		P	BAIXA FERTILIDADE		P
	ANGUS (n=40)	NELORE (n=44)		ANGUS (n=40)	NELORE (n=44)	
	Média $\pm$ SEM	Média $\pm$ SEM		Média $\pm$ SEM	Média $\pm$ SEM	
Defeitos maiores (%)	8,60 $\pm$ 0,32	7,82 $\pm$ 0,24	0,0857	<b>13,68<math>\pm</math>0,39</b>	10,82 $\pm$ 0,31	<b>&lt;,0001</b>
Defeitos menores (%)	11,92 $\pm$ 0,32	12,27 $\pm$ 0,30	0,4243	12,48 $\pm$ 0,31	<b>14,52<math>\pm</math>0,39</b>	<b>0,0001</b>
ALH - Amplitude do movimento lateral da cabeça ( $\mu$ m)	5,68 $\pm$ 0,20	<b>6,71<math>\pm</math>0,18</b>	<b>0,0002</b>	6,53 $\pm$ 0,12	6,61 $\pm$ 0,20	0,7064
BCF - Frequência de batimento cruzado (Hz)	29,69 $\pm$ 0,53	30,22 $\pm$ 0,56	0,1038	32,00 $\pm$ 0,78	31,42 $\pm$ 0,80	0,2639
LIN - Linearidade (%)	<b>52,75<math>\pm</math>1,33</b>	49,48 $\pm$ 0,93	<b>0,0440</b>	47,68 $\pm$ 0,72	48,79 $\pm$ 1,21	0,4067
Velocidade rápida (%)	47,40 $\pm$ 2,06	46,80 $\pm$ 2,32	0,8471	46,45 $\pm$ 1,87	45,46 $\pm$ 2,61	0,7531
Velocidade média (%)	<b>14,65<math>\pm</math>1,34</b>	10,34 $\pm$ 1,15	<b>0,0162</b>	<b>15,90<math>\pm</math>1,10</b>	8,75 $\pm$ 0,71	<b>&lt;,0001</b>

VARIÁVEL	ALTA FERTILIDADE			BAIXA FERTILIDADE		
	ANGUS (n=40)	NELORE (n=44)	P	ANGUS (n=40)	NELORE (n=44)	P
	Média±SEM	Média±SEM		Média±SEM	Média±SEM	
Defeitos maiores (%)	8,60±0,32	7,82±0,24	0,0857	13,68±0,39	10,82±0,31	<,0001
Defeitos menores (%)	11,92±0,32	12,27±0,30	0,4243	12,48±0,31	14,52±0,39	0,0001
ALH - Amplitude do movimento lateral da cabeça (µm)	5,68±0,20	6,71±0,18	0,0002	6,53±0,12	6,61±0,20	0,7064
BCF - Frequência de batimento cruzado (Hz)	29,69±0,53	30,22±0,56	0,1038	32,00±0,78	31,42±0,80	0,2639
LIN - Linearidade (%)	52,75±1,33	49,48±0,93	0,0440	47,68±0,72	48,79±1,21	0,4067
Velocidade rápida (%)	47,40±2,06	46,80±2,32	0,8471	46,45±1,87	45,46±2,61	0,7531
Velocidade lenta (%)	23,18±1,24	26,11±1,37	0,1187	25,43±1,20	24,07±1,94	0,5342
Estáticos (%)	14,83±1,86	16,91±2,10	0,7459	12,15±1,43	21,79±2,30	<,0001
Atividade mitocondrial alta - DAB Classe I (%)	57,58±2,01	49,26±2,16	0,0051	62,00±1,86	45,19±3,07	<,0001
Atividade mitocondrial média - DAB Classe II (%)	25,05±1,34	28,93±1,21	0,0247	22,03±1,28	35,37±2,17	<,0001
Atividade mitocondrial baixa - DAB Classe III (%)	6,55±0,92	7,17±0,71	0,1017	6,55±0,77	7,26±1,32	0,3765
Ausência de atividade mitocondrial - DAB Classe IV (%)	10,85±1,06	14,64±1,26	0,0083	8,30±0,68	12,26±1,01	0,002
Índice de atividade mitocondrial (%)	71,74±1,52	65,52±1,70	0,0071	74,65±1,48	64,69±2,05	<,0001
Potencial de membrana mitocondrial baixo (%)	44,24±1,79	49,61±1,19	0,0147	61,28±1,44	52,86±0,75	<,0001
Potencial de membrana mitocondrial médio (%)	18,70±1,14	18,05±0,61	0,6145	24,54±0,97	20,11±0,97	0,0007
Potencial de membrana mitocondrial alto (%)	37,06±1,06	32,35±0,93	0,0012	14,18±0,93	27,03±0,85	<,0001
Integridade de membrana acrossomal (%)	60,04±2,29	55,31±1,88	0,1122	64,04±2,26	51,75±2,01	0,0003
Presença de EROs e membrana Íntegra (%)	17,57±1,17	12,61±1,46	0,0028	24,58±2,35	11,43±1,60	<,0001
TBARS (ng/10 <sup>6</sup> espermatozoides)	10,80±1,30	11,89±1,19	0,3128	17,36±1,69	4,99±0,57	<,0001
Suscetibilidade a danos de DNA (%)	0,17±0,02	2,98±0,16	<,0001	0,50±0,04	3,23±0,27	<,0001

Fonte: Leite (2022)

Resultados em média ± SEM e valor de P. Valores de P<0,05, são apresentados em vermelho. Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

Tabela 3 - Efeito da fertilidade (alta e baixa) sobre os grupos genéticos (Angus e Nelore) de atributos espermáticos de amostras de sêmen criopreservado

VARIÁVEL	ANGUS		P	NELORE		P
	ALTA FERTILIDADE (n=40)	BAIXA FERTILIDADE (n=40)		ALTA FERTILIDADE (n=44)	BAIXA FERTILIDADE (n=28)	
	Média±SEM	Média ±SEM		Média ±SEM	Média ±SEM	
Defeitos maiores (%)	8,60±0,32	13,68±0,39	<,0001	7,82±0,24	10,82±0,31	<,0001
Defeitos menores (%)	11,92±0,32	12,48±0,31	0,2193	12,27±0,30	14,52±0,39	<,0001
ALH - Amplitude do movimento lateral da cabeça (µm)	5,68±0,20	6,53±0,12	0,0005	6,71±0,18	6,61±0,20	0,7227
BCF - Frequência de batimento cruzado (Hz)	29,69±0,53	32,00±0,78	0,0170	30,22±0,56	31,42±0,80	0,2070
LIN - Linearidade (%)	52,75±1,33	47,68±0,72	0,0014	49,48±0,93	48,79±1,21	0,6501
Velocidade rápida (%)	47,40±2,06	46,45±1,87	0,7334	46,80±2,32	45,46±2,61	0,7108
Velocidade média (%)	14,65±1,34	15,90±1,10	0,4725	10,34±1,15	8,75±0,71	0,2424
Velocidade lenta (%)	23,18±1,24	25,43±1,20	0,1965	26,11±1,37	24,07±1,94	0,3805
Estáticos (%)	14,83±1,86	12,15±1,43	0,2029	16,91±2,10	21,79±2,30	0,0043
Atividade mitocondrial alta - DAB Classe I (%)	57,58±2,01	62,00±1,86	0,0909	49,26±2,16	45,19±3,07	0,3316
Atividade mitocondrial média - DAB Classe II (%)	25,05±1,34	22,03±1,28	0,0932	28,93±1,21	35,37±2,17	0,0081
Atividade mitocondrial baixa - DAB Classe III (%)	6,55±0,92	6,55±0,77	0,3802	7,17±0,71	7,26±1,32	0,2429

VARIÁVEL	ANGUS		P	NELORE		P
	ALTA FERTILIDADE (n=40)	BAIXA FERTILIDADE (n=40)		ALTA FERTILIDADE (n=44)	BAIXA FERTILIDADE (n=28)	
	Média±SEM	Média ±SEM		Média ±SEM	Média ±SEM	
Defeitos maiores (%)	8,60±0,32	13,68±0,39	<,0001	7,82±0,24	10,82±0,31	<,0001
Defeitos menores (%)	11,92±0,32	12,48±0,31	0,2193	12,27±0,30	14,52±0,39	<,0001
ALH - Amplitude do movimento lateral da cabeça (µm)	5,68±0,20	6,53±0,12	0,0005	6,71±0,18	6,61±0,20	0,7227
BCF - Frequência de batimento cruzado (Hz)	29,69±0,53	32,00±0,78	0,0170	30,22±0,56	31,42±0,80	0,2070
LIN - Linearidade (%)	52,75±1,33	47,68±0,72	0,0014	49,48±0,93	48,79±1,21	0,6501
Velocidade rápida (%)	47,40±2,06	46,45±1,87	0,7334	46,80±2,32	45,46±2,61	0,7108
Velocidade média (%)	14,65±1,34	15,90±1,10	0,4725	10,34±1,15	8,75±0,71	0,2424
Velocidade lenta (%)	23,18±1,24	25,43±1,20	0,1965	26,11±1,37	24,07±1,94	0,3805
Estáticos (%)	14,83±1,86	12,15±1,43	0,2029	16,91±2,10	21,79±2,30	0,0043
Atividade mitocondrial alta - DAB Classe I (%)	57,58±2,01	62,00±1,86	0,0909	49,26±2,16	45,19±3,07	0,3316
Atividade mitocondrial média - DAB Classe II (%)	25,05±1,34	22,03±1,28	0,0932	28,93±1,21	35,37±2,17	0,0081
Ausência de atividade mitocondrial - DAB Classe IV (%)	10,85±1,06	8,30±0,68	0,0732	14,64±1,26	12,26±1,01	0,1473
Índice de atividade mitocondrial (%)	71,74±1,52	74,65±1,48	0,134	65,52±1,70	64,69±2,05	0,7325
Potencial de membrana mitocondrial baixo (%)	44,24±1,79	61,28±1,44	<,0001	49,61±1,19	52,86±0,75	0,0234
Potencial de membrana mitocondrial médio (%)	18,70±1,14	24,54±0,97	0,0002	18,05±0,61	20,11±0,97	0,0393
Potencial de membrana mitocondrial alto (%)	37,06±1,06	14,18±0,93	<,0001	32,35±0,93	27,03±0,85	0,0002
Integridade de membrana acrossomal (%)	60,04±2,29	64,04±2,26	0,2169	55,31±1,88	51,75±2,01	0,2193
Presença de EROs e membrana Íntegra (%)	17,57±1,17	24,58±2,35	0,0465	12,61±1,46	11,43±1,60	0,6330
TBARS (ng/10 <sup>6</sup> espermatozoides)	10,80±1,30	17,36±1,69	0,0022	11,89±1,19	4,99±0,57	<,0001
Suscetibilidade a danos de DNA (%)	0,17±0,02	0,50±0,04	<,0001	2,98±0,16	3,23±0,27	0,3169

Fonte: Leite (2022)

Resultados em média ± SEM e valor de P. Valores de P<0,05, são apresentados em vermelho.

Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

Tabela 4 - Efeito fertilidade (alta e baixa) em variáveis sem interação de atributos espermáticos de amostras de sêmen criopreservado

VARIÁVEL	ALTA FERTILIDADE (n=84)	BAIXA FERTILIDADE (n=68)	P
	Média±SEM	Média±SEM	
Concentração espermática (x10 <sup>6</sup> /mL)	82,18±2,13	82,34±2,27	0,8414
Defeitos totais (%)	20,79±0,41	25,71±0,26	<,0001
Motilidade total (%)	61,02±1,67	60,28±1,49	0,3318
Motilidade Progressiva (%)	39,23±1,22	37,65±1,17	0,2245
VAP - Velocidade média (µm/s)	81,52±1,19	80,88±1,12	0,8647
VSL - Velocidade linear (µm/s)	65,90±0,84	64,22±0,93	0,3582
VCL - Velocidade curvilínea (µm/s)	138,11±2,77	140,00±2,36	0,2359
STR - Retilinearidade (%)	81,31±0,65	79,35±0,58	0,0271
Integridade de membrana plasmática (%)	48,94±1,51	43,32±2,02	0,0073

Fonte: Leite (2022)

Resultados em média ± SEM e valor de P. Valores de P<0,05, são apresentados em vermelho.

Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

Tabela 5 - Efeito raça (Angus e Nelore) em variáveis sem interação de atributos espermáticos de amostras de sêmen criopreservado

VARIÁVEL	ANGUS (n=80)	NELORE (n=72)	P
	Média±SEM	Média±SEM	
Concentração espermática (x10 <sup>6</sup> /mL)	80,88±2,09	83,78±2,30	0,3165
Defeitos totais (%)	23,85±0,46	22,03±0,42	0,0133
Motilidade total (%)	62,61±1,34	58,56±1,86	0,0756
Motilidade Progressiva (%)	39,63±1,09	37,29±1,31	0,1613
VAP - Velocidade média (µm/s)	77,73±1,05	85,12±1,13	<,0001
VSL - Velocidade linear (µm/s)	62,67±0,82	67,90±0,86	<,0001
VCL - Velocidade curvilínea (µm/s)	131,86±2,36	146,84±2,63	<,0001
STR - Retilinearidade (%)	80,91±0,64	79,90±0,62	0,2251
Integridade de membrana plasmática (%)	49,28±1,82	43,26±1,61	0,0042

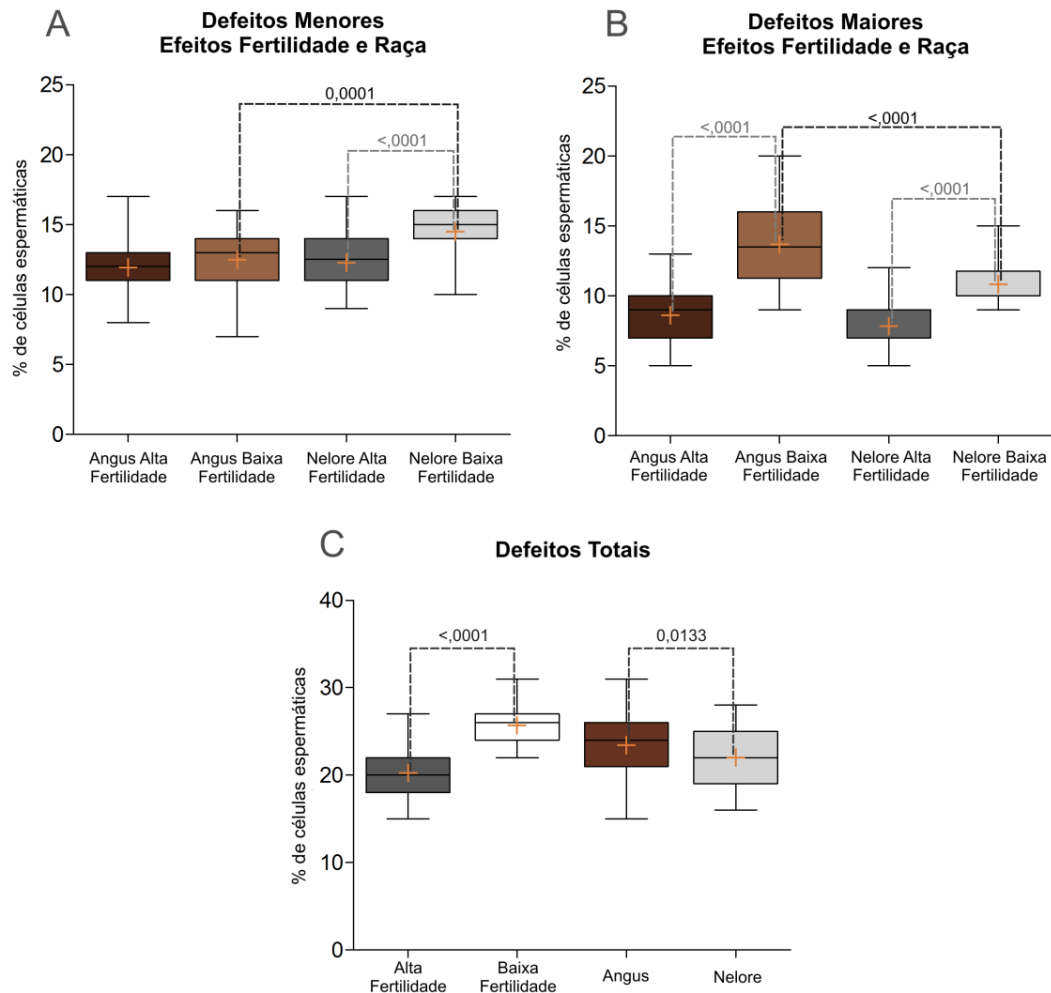
Fonte: Leite (2022)

Resultados em média ± SEM e valor de P. Valores de P<0,05, são apresentados em vermelho. Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

### 3.3.3.1 Morfologia espermática

A análise morfológica demonstrou que o grupo Angus de baixa (Ab) fertilidade apresentou mais defeitos maiores em comparação com os grupos Angus de alta (Aa) e Nelore de baixa (Nb), enquanto este último apresentou mais defeitos maiores em comparação com o grupo Nelore de alta fertilidade (Na) (Tabelas 2 e 3 e Figura 2B). Quanto aos defeitos menores, o grupo Nb apresentou mais defeitos quando comparado com os grupos Ab e Na (Tabelas 2 e 3 e Figura 2A). Não houve interação para os resultados de defeitos totais, com os animais de baixa fertilidade apresentando mais defeitos que os de alta e os animais da raça Angus mais defeitos que os da raça Nelore (Tabela 4 e 5 e Figura 2C).

Figura 2 - Gráficos dos resultados de morfologia espermática nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartil, limites mínimo e máximo (*whiskers*) e média (+ em laranja); diferenças entre os grupos são marcadas por linhas com o valor de *P* sobre as mesmas. Em A: defeitos menores (interação fertilidade\*raça); Em B: defeitos maiores (interação fertilidade\*raça); em C: defeitos totais (sem interação).

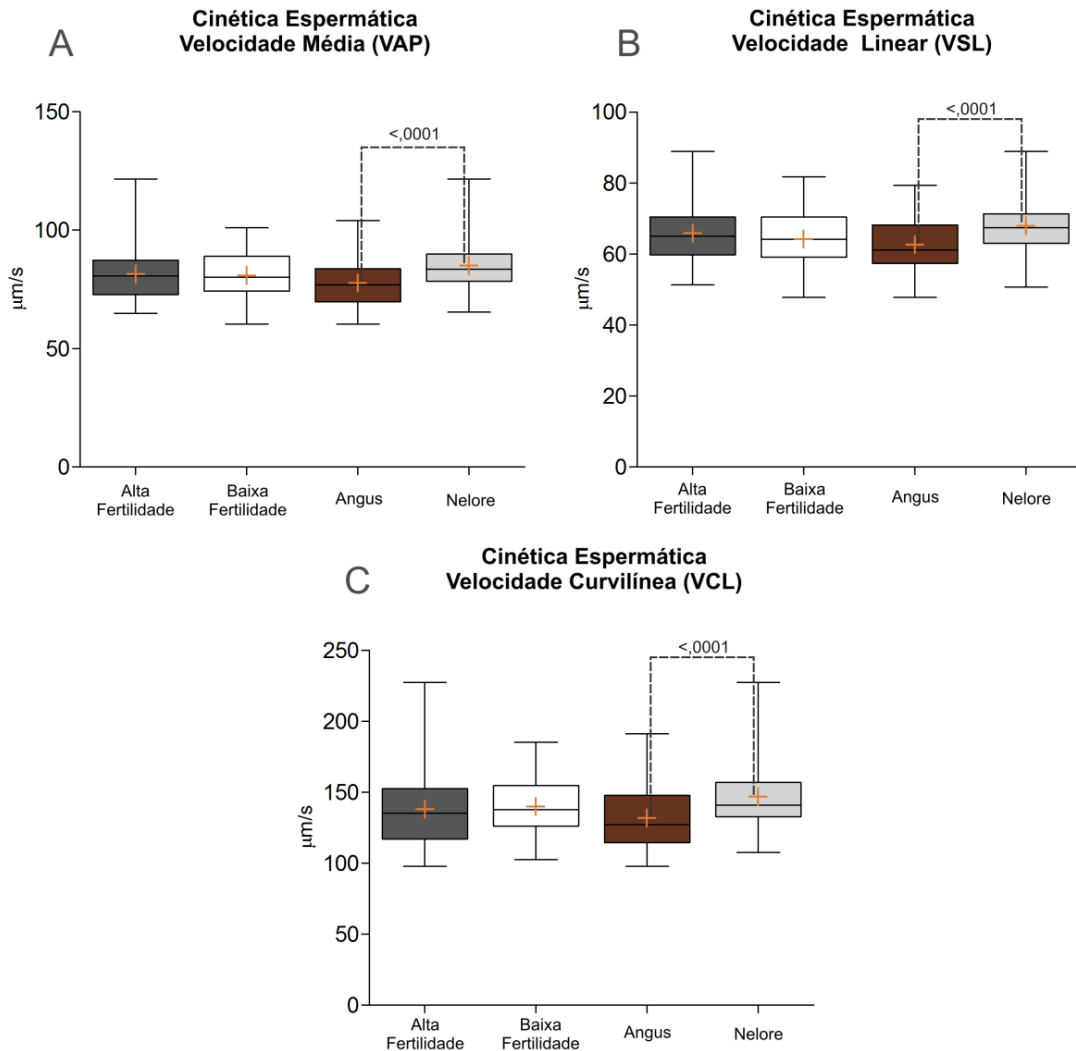
### 3.3.3.2 Cinética espermática

Não foi observada diferença na motilidade total e progressiva entre os grupos. Em relação aos padrões de velocidade espermática, os touros da raça Nelore apresentaram maior velocidade média, linear, e curvelinear, em comparação aos animais da raça Angus (Tabela 5 e Figura 3). Uma maior porcentagem de células espermáticas com padrão de retilinearidade foi observada no grupo de alta fertilidade em comparação com o de baixa fertilidade (Tabela 4 e Figura 4A). Quanto aos resultados de variáveis com interação, o grupo Angus de alta fertilidade apresentou maior linearidade quando comparado com Angus de baixa e Nelore de alta fertilidade (Tabelas 2 e 3 e Figura 4B). O grupo Angus de baixa fertilidade



apresentou maior amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH) e frequência de batimento de flagelos (BCF) em comparação com os animais de alta fertilidade da mesma raça (Tabela 3, Figura 5B), os quais, por sua vez, registraram menor ALH que o grupo Nelore de alta fertilidade (Tabelas 2 e 3 e Figura 5A).

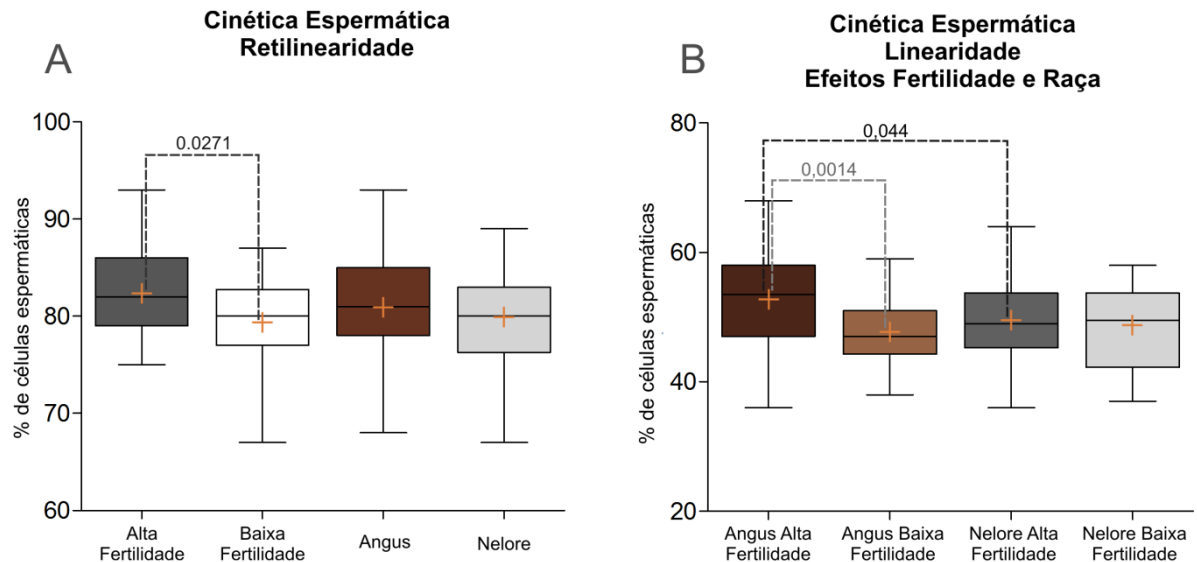
Figura 3 - Gráficos dos resultados de velocidades (cinética espermática) nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartil, limites mínimo e máximo (*whiskers*) e média (+ em laranja); diferenças entre os grupos são marcadas por linhas com o valor de *P* sobre as mesmas. Em A: velocidade média; Em B: velocidade linear; Em C: velocidade curvilínea; resultados sem interação (alta fertilidade vs baixa fertilidade e Angus vs Nelore).

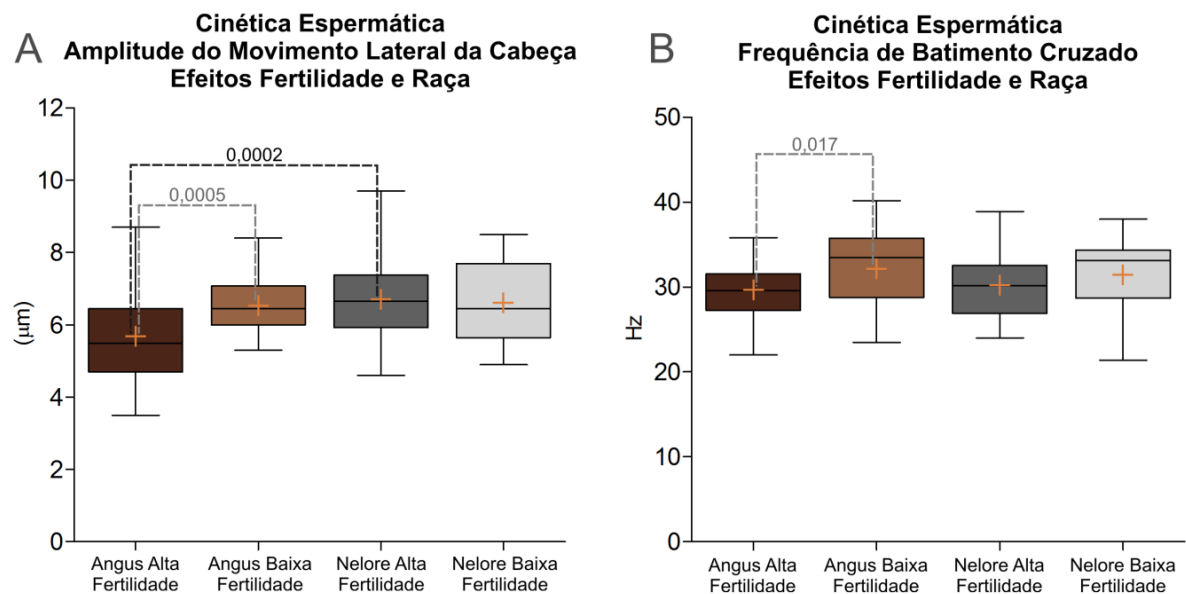
Figura 4 - Gráficos dos resultados de retilinearidade e linearidade (cinética espermática) nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartis, limites mínimo e máximo (*whiskers*) e média (+ em laranja); diferenças entre os grupos são marcadas por linhas com o valor de *P* sobre as mesmas. Em A: retilinearidade (sem interação); Em B: linearidade (interação fertilidade\*raça).

Figura 5 - Gráficos dos resultados de ALH e BCF (cinética espermática) nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade



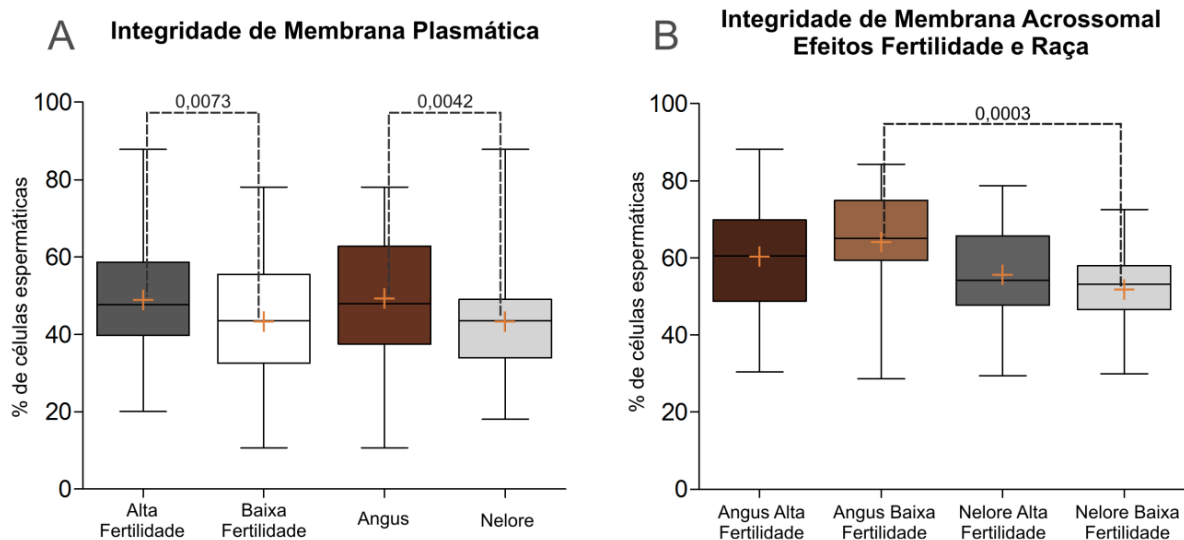
Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartis, limites mínimo e máximo (*whiskers*) e média (+ em laranja); diferenças entre os grupos são marcadas por linhas com o valor de *P* sobre as mesmas. Em A: amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH); Em B: frequência de batimento de flagelos (BCF); resultados com interação fertilidade\*raça.

### 3.3.3.3 Integridade de membranas plasmática e acrossomal

Touros de alta fertilidade tiveram maior integridade de membrana plasmática (variável sem interação) em comparação com os de baixa fertilidade, ao passo que os touros da raça Angus apresentaram membranas mais íntegras quando comparados aos da raça Nelore (Tabelas 4 e 5 e Figura 6A). Quanto à integridade acrossomal, houve diferença entre os animais dos grupos de baixa fertilidade, com o grupo Ab apresentando maior porcentagem de células com integridade de membrana acrossomal do que o grupo Nb (Tabela 2 e Figura 6B).

Figura 6 - Gráficos dos resultados de integridade de membranas plasmática e acrossomal nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade



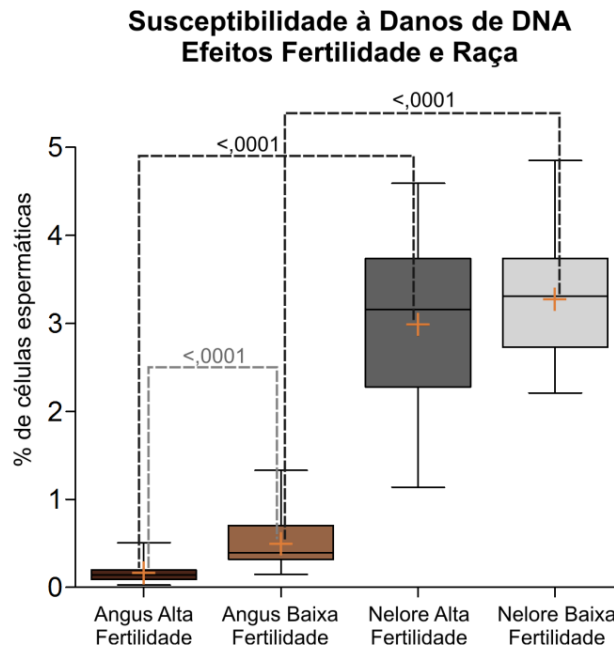
Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartis, limites mínimo e máximo (*whiskers*) e média (+ em laranja); diferenças entre os grupos são marcadas por linhas com o valor de *P* sobre as mesmas. Em A: integridade de membrana plasmática (sem interação); Em B: integridade de membrana acrossomal (interação fertilidade\*raça).

### 3.3.3.4 Integridade de DNA

Os resultados do desafio por meio do ensaio da estrutura da cromatina espermática mostram uma grande diferença entre os animais da raça Angus e Nelore. Foi observada uma maior suscetibilidade nas amostras espermáticas da raça Nelore quando comparada à raça Angus, tanto nos grupos de alta quanto no de baixa fertilidade (Tabela 2 e Figura 7). Os resultados mostram ainda que, na raça Angus, o grupo de baixa fertilidade é mais suscetível a danos de DNA que o grupo de alta fertilidade (Tabela 3 e Figura 7).

Figura 7 - Gráfico dos resultados de suscetibilidade à fragmentação de DNA nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade



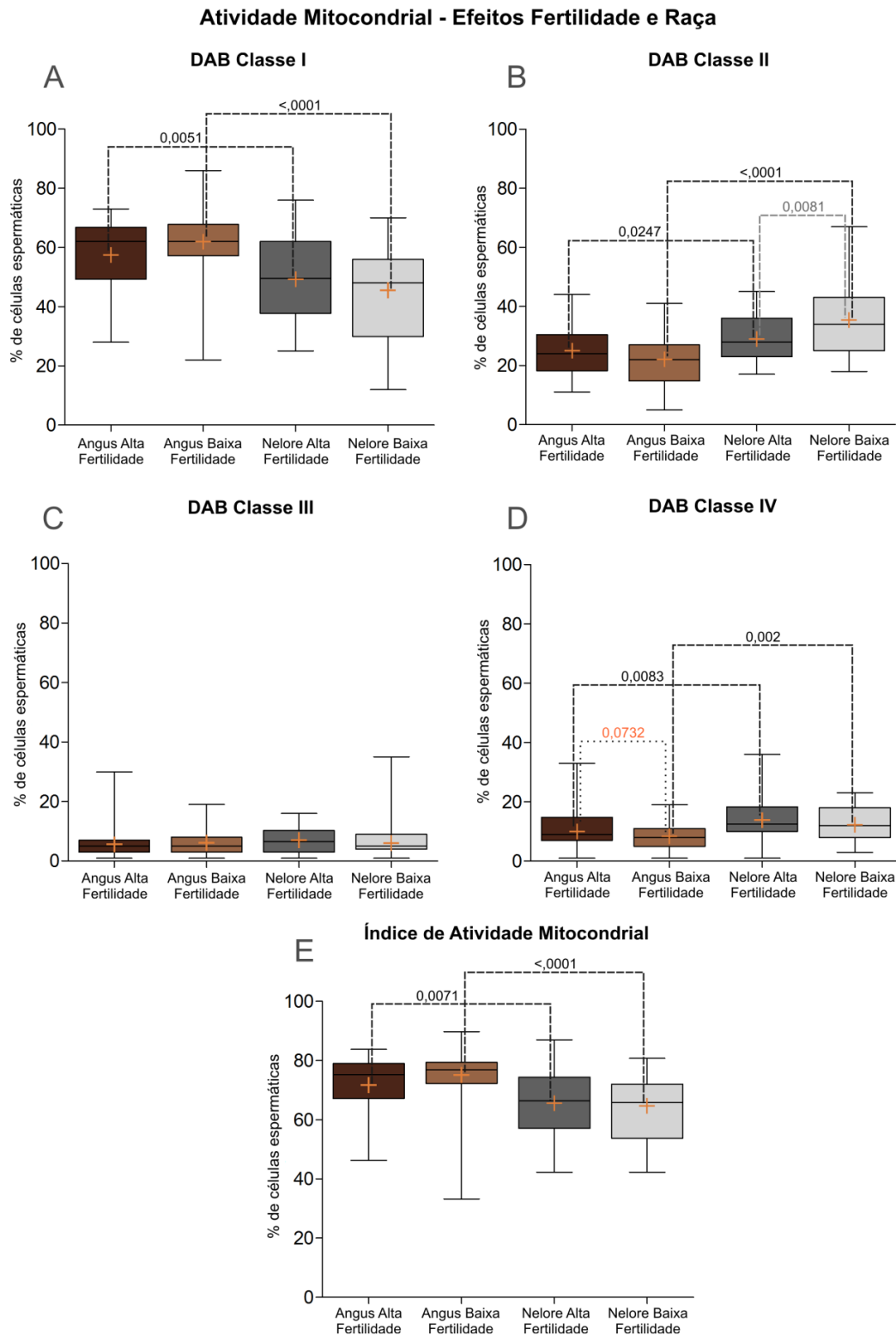
Fonte: Leite (2022)

Resultados, com interação fertilidade\*raça, apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartis, limites mínimo e máximo (*whiskers*) e média (+ em laranja); diferenças entre os grupos são marcadas por linhas com o valor de *P* sobre as mesmas.

### 3.3.3.5 Atividade mitocondrial e potencial de membrana mitocondrial

Os resultados de atividade mitocondrial mostram que os grupos Angus de alta e baixa fertilidade possuem mais espermatozoides com alta atividade mitocondrial (DAB Classe I) quando comparado com os respectivos grupos da raça Nelore (Tabela 2 e Figura 8A). O oposto foi observado em relação à atividade mitocondrial média (DAB Classe II), com amostras de touros Nelore dos dois grupos de fertilidade apresentando maior porcentagem de células em comparação, respectivamente, aos grupos Angus (Tabela 2 e Figura 8B). O grupo Nelore de baixa fertilidade também apresentou uma maior porcentagem de células com atividade média em comparação com o Nelore de alta fertilidade (Tabelas 3 e Figura 8B). Não houve diferença entre os grupos para baixa atividade mitocondrial (DAB Classe III) (Figura 8C). Quanto à ausência de atividade mitocondrial (DAB Classe IV), os grupos da raça Nelore apresentaram maior porcentagem de espermatozoides nesta classe quando comparados com os respectivos grupos da raça Angus (Tabela 2 e Figura 8D). No índice de atividade mitocondrial, os resultados mostram que os touros da raça Angus apresentaram maior índice em relação à Nelore, tanto entre nos animais de alta fertilidade quanto nos de baixa fertilidade (Tabela 2 e Figura 8E).

Figura 8 - Gráficos dos resultados de atividade mitocondrial nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade

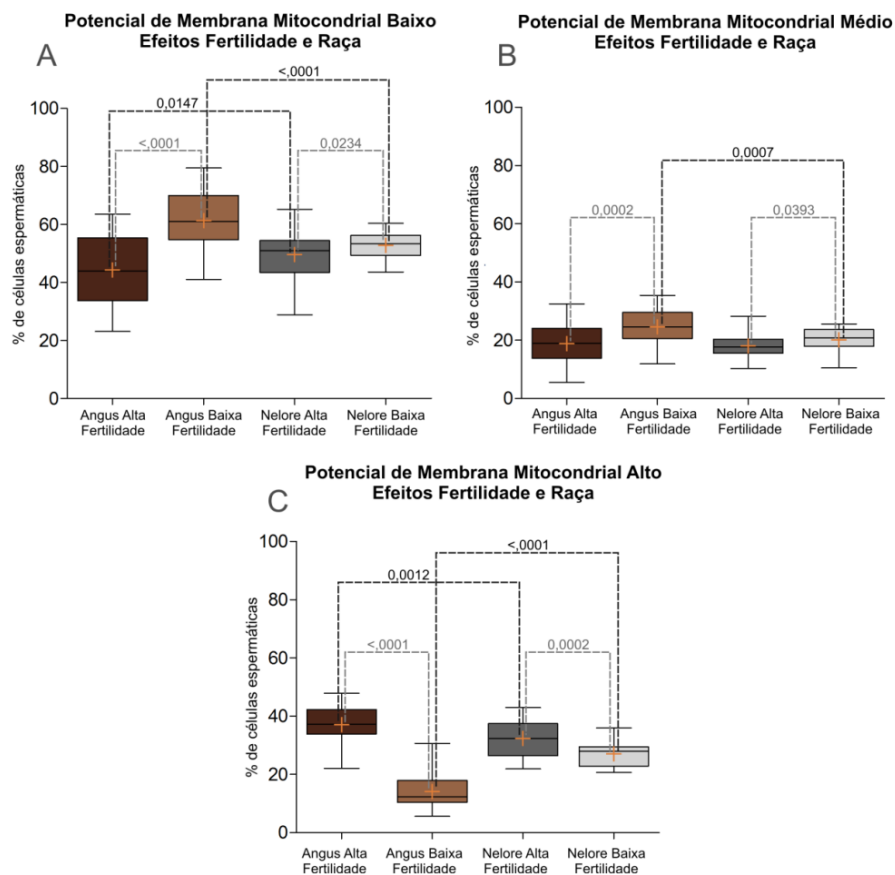


Fonte: Leite (2022)

Resultados, com interação fertilidade\*raça, apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartis, limites mínimo e máximo (*whiskers*) e média (+ em laranja); diferenças entre os grupos são marcadas por linhas com o valor de *P* sobre as mesmas. Em A: atividade mitocondrial alta; Em B: atividade mitocondrial média; Em C: atividade mitocondrial baixa; Em D: ausência de atividade mitocondrial; em E: índice de atividade mitocondrial.

Os resultados de potencial de membrana mitocondrial (PMM) revelam que o grupo Ab apresentou maior porcentagem de espermatozoides com potencial baixo e médio quando comparado com os grupos Aa e Nb (Tabelas 2 e 3 e Figuras 9A e 9B). Na raça Nelore, os animais de baixa fertilidade também apresentaram maior porcentagem de espermatozoides com PMM baixo e médio (Tabela 3 e Figuras 9A e 9B). A comparação dos grupos de alta fertilidade mostra a raça Nelore com maior porcentagem de células com potencial baixo em comparação com a raça Angus (Tabela 2 e Figura 9A). Em relação aos resultados de PMM alto, o grupo Aa apresentou maior porcentagem de células tanto em comparação com o grupo Na quanto com o Ab (Tabelas 2 e 3 e Figura 9C). Os animais do grupo Nb apresentaram mais células com PMM alto em comparação com o grupo Ab e menos células com potencial alto em comparação com o grupo Na (Tabelas 2 e 3 e Figura 9C).

Figura 9 - Gráficos dos resultados de potencial de membrana mitocondrial nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

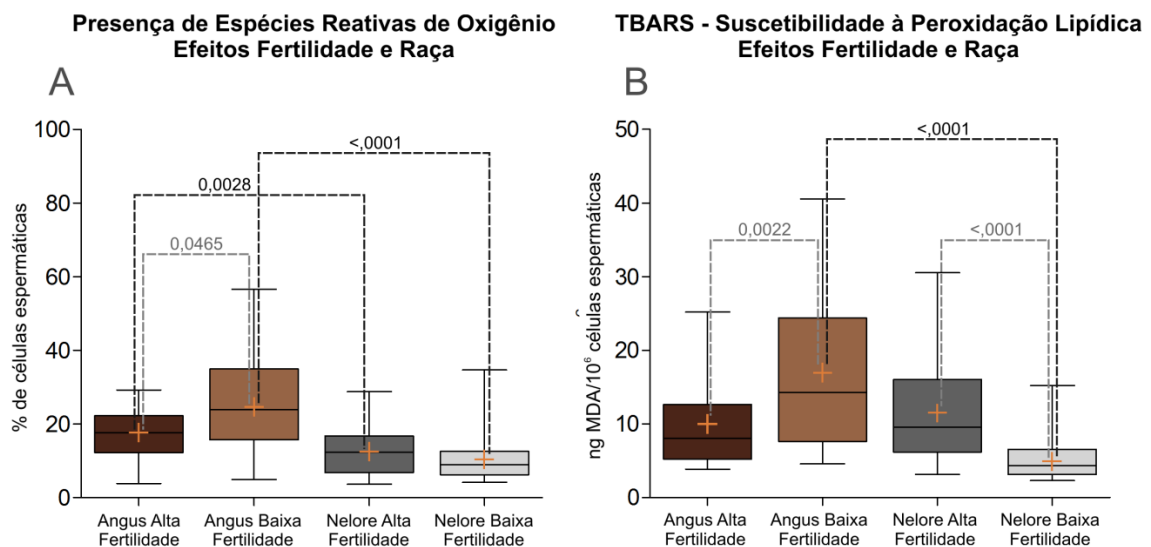
Resultados, com interação fertilidade\*raça, apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartis, limites mínimo e máximo (*whiskers*) e média (+ em laranja); diferenças entre os grupos

são marcadas por linhas com o valor de  $P$  sobre as mesmas. Em A: potencial de membrana mitocondrial (PMM) baixo; em B: PMM médio; Em C: PMM alto.

### 3.3.3.6 Status oxidativo

Uma maior presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) bem como uma maior suscetibilidade à peroxidação lipídica foi observada nos Angus de baixa fertilidade em comparação tanto aos Angus de alta fertilidade quanto ao grupo Nelore de baixa fertilidade (Tabelas 2 e 3 e Figuras 10A e 10B). Os resultados também mostram que, dentro dos grupos de alta fertilidade, a raça Angus apresentou maior concentração de EROs do que a raça Nelore (Tabela 2 e Figura 10A). Por outro lado, o grupo Nelore de alta fertilidade teve uma maior suscetibilidade à peroxidação lipídica quando comparado com o grupo de baixa fertilidade (Tabela 3 e Figura 10B).

Figura 10 - Gráficos dos resultados de *status* oxidativo nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

Resultados, com interação fertilidade\*raça, apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartis, limites mínimo e máximo (*whiskers*) e média (+ em laranja); diferenças entre os grupos são marcadas por linhas com o valor de  $P$  sobre as mesmas. Em A: presença de espécies reativas de oxigênio; Em B: suscetibilidade ao desafio de peroxidação lipídica (TBARS).

### 3.3.3.7 Análise de correlação

O grupo Angus de baixa fertilidade apresentou correlação positiva entre índice de atividade mitocondrial e baixo potencial de membrana mitocondrial ( $r=0,46656$ ,  $P=0,0024$ ), o que indica que a alta atividade mitocondrial está relacionada com o baixo PMM. Além disso, foi observada correlação positiva entre índice de atividade

mitocondrial e suscetibilidade à peroxidação lipídica ( $r=0,394$ ,  $P=0,0131$ ), sendo que esta última apresenta correlação positiva com suscetibilidade a danos de DNA ( $r=0,634$ ,  $P<,0001$ ). Por fim, o grupo apresentou correlação inversa entre a presença de EROs e integridade de membrana plasmática ( $r=-0,330$ ,  $P=0,0405$ ). Por outro lado, resultados opostos foram observados no grupo Angus de alta fertilidade. Este grupo apresentou correlação positiva entre índice de atividade mitocondrial e alto PMM ( $r=0,484$ ,  $P=0,0015$ ), enquanto o índice também teve correlação inversa com suscetibilidade a danos de DNA ( $r=-0,549$ ,  $P=0,0002$ ). No grupo Aa foi observada ainda correlação inversa entre suscetibilidade a danos de DNA e alto PMM ( $r=-0,404$ ,  $P=0,0098$ ).

O grupo Nelore de baixa fertilidade, como os Ab, apresentaram correlações indicando problemas mitocondriais. Neste grupo, foi observada correlação inversa entre o índice de atividade mitocondrial e alto PMM ( $r=-0,392$ ,  $P=0,0434$ ) e entre o índice e suscetibilidade a danos de DNA ( $r=-0,509$ ,  $P=0,0067$ ). Além disso, o grupo Nb apresentou correlação positiva entre suscetibilidade a danos de DNA e suscetibilidade à peroxidação lipídica ( $r=0,560$ ,  $P=0,002$ ). No grupo Nelore de alta fertilidade houve correlação inversa entre o índice de atividade mitocondrial e suscetibilidade a danos de DNA ( $r=-0,320$ ,  $P=0,0391$ ). No entanto, neste grupo foi observada correlação positiva entre presença de EROs e danos de DNA ( $r=0,364$ ,  $P=0,015$ ). Os quadros completos de correlação dos dados funcionais por grupo, com variáveis relacionadas ao status mitocondrial, oxidativo, de membranas e DNA estão disponíveis no Apêndice 1.

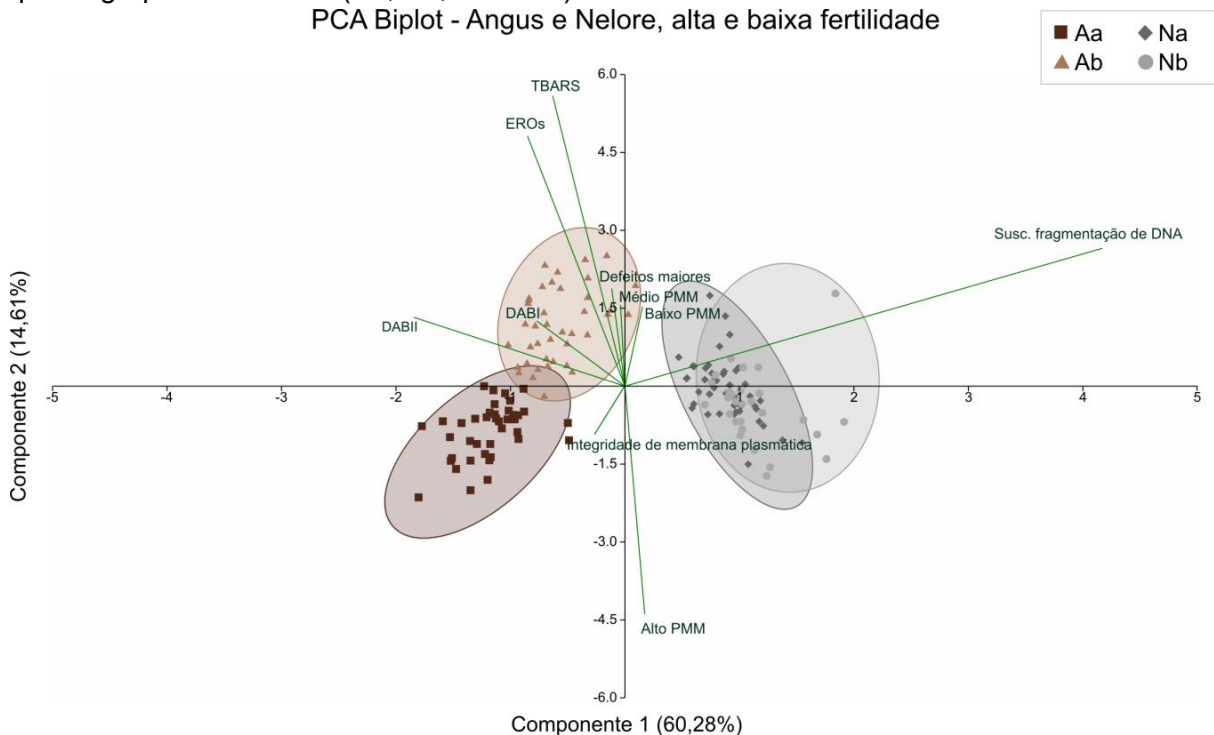
### 3.3.3.8 Análise de componentes principais

Nas análises de componentes principais (PCA), as variáveis foram selecionadas para cada modelo considerando os resultados de *VIP score* e pré-análise dos valores de *loadings* (Apêndice 2). Na análise com os quatro grupos estudados (Aa, Ab, Na, Nb), os resultados mostram que os componentes 1 e 2 foram responsáveis por 60,28% e 14,61%, respectivamente, com uma variância total de 74,89%. O gráfico PCA *biplot* mostra uma separação clara entre as raças (Angus e Nelore), uma separação com uma pequena sobreposição das elipses de IC entre os grupos Aa e Ab e sobreposição dos grupos e elipses entre os grupos da raça Nelore (Figura 11). O gráfico mostra ainda que suscetibilidade à fragmentação de DNA, suscetibilidade à peroxidação lipídica e presença de EROs (variáveis com



maiores valores de *VIP score*), juntamente com alto PMM, são as variáveis com maior efeito na variância dos componentes e na separação dos grupos (Figura 7).

Figura 11 - PCA em apresentação *biplot* de variáveis da análise funcional espermática nos quatro grupos estudados (Aa, Ab, Na e Nb)

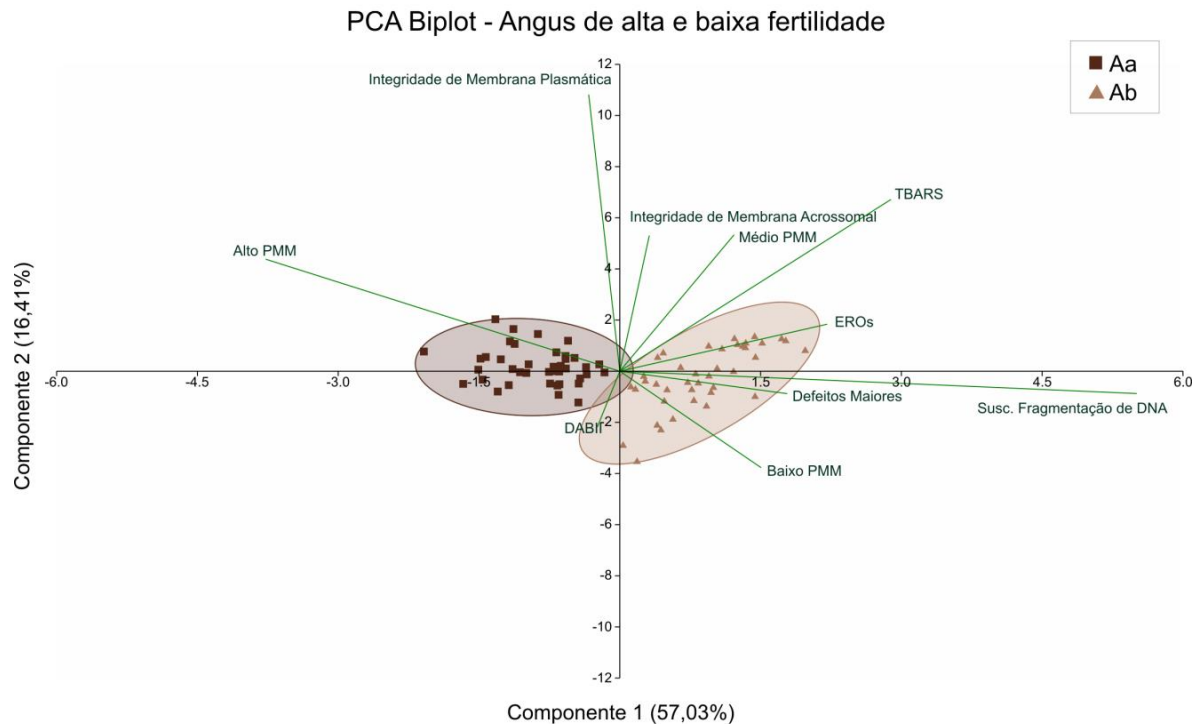


Fonte: Leite (2022)

Representação gráfica da separação entre os grupos Aa, Ab, Na e Nb com os componentes principais 1 e 2, que respondem por uma variância total de 74,89%. A variância explicada pelos componentes é apresentada entre parênteses. Os *clusters* das amostras dos grupos são indicados conforme a legenda e circundados por elipses de IC. As linhas e texto em verde indicam as variáveis selecionadas e a importância das mesmas (escala *eigenvalue*) na variância e separação dos grupos.

Os resultados da PCA entre os grupos da raça Angus de alta e baixa fertilidade mostram que o componente 1 foi responsável por 57,03% e o componente 2 por 16,41%, com um total de 73,44% da variância sendo explicado. O gráfico de PCA *biplot* mostra uma separação entre os *clusters* das amostras dos grupos, com uma pequena sobreposição das elipses de IC, menor do que a observada na comparação dos quatro grupos conjuntamente (Figura 12). Suscetibilidade à fragmentação de DNA, suscetibilidade à peroxidação lipídica, baixo PMM, presença de EROs e defeitos maiores são as variáveis com maior efeito sobre o grupo de baixa fertilidade (Figura 12). Em contrapartida, alto PMM e integridade de membrana plasmática possuem maior efeito sobre o grupo de alta fertilidade (Figura 12).

Figura 12 - PCA em apresentação *biplot* de variáveis da análise funcional espermática nos grupos Angus de alta e baixa fertilidade

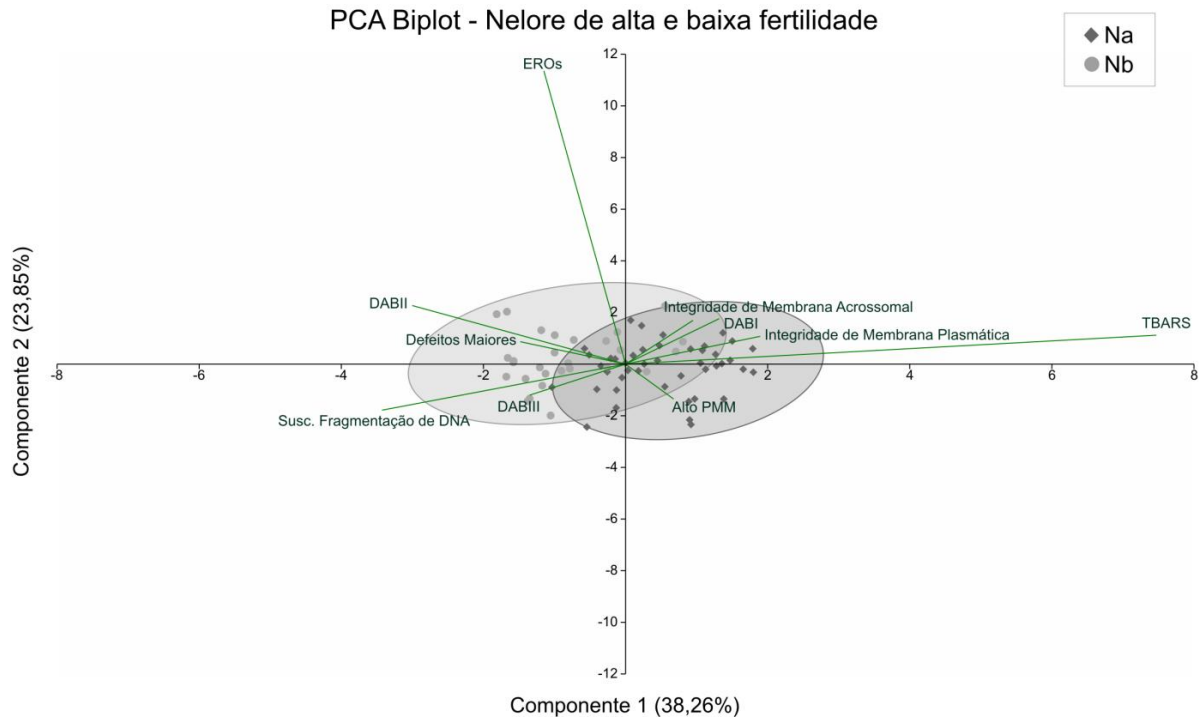


Fonte: Leite (2022)

Representação gráfica da separação entre os grupos Aa e Ab com os componentes principais 1 e 2, que respondem por uma variância total de 73,44%. A variância explicada pelos componentes é apresentada entre parênteses. Os *clusters* das amostras dos grupos são indicados conforme a legenda e circundados por elipses de IC. As linhas e texto em verde indicam as variáveis selecionadas e a importância das mesmas (escala *eigenvalue*) na variância e separação dos grupos.

Na análise com os grupos de alta e baixa fertilidade da raça Nelore não foi observada separação entre os *clusters* de amostras dos grupos, com sobreposição das elipses de IC. Os componentes 1 e 2 foram responsáveis por 38,26% e 23,85% da variância, respectivamente, com um total de 62,11%. Apesar de não haver separação entre os grupos, o gráfico PCA *biplot* mostra que presença de EROs, suscetibilidade à fragmentação de DNA e atividade mitocondrial média possuem maior influência sobre amostras do grupo Nelore de baixa fertilidade, enquanto suscetibilidade à peroxidação lipídica, integridade de membrana plasmática e alta atividade mitocondrial possuem maior influência sobre o grupo Nelore de alta fertilidade (Figura 13).

Figura 13 - PCA em apresentação *biplot* de variáveis da análise funcional espermática nos grupos Nelore de alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

Representação gráfica da separação entre os grupos Na e Nb com os componentes principais 1 e 2, que respondem por uma variância total de 62,11%. A variância explicada pelos componentes é apresentada entre parênteses. Os *clusters* das amostras dos grupos são indicados conforme a legenda e circundados por elipses de IC. As linhas e texto em verde indicam as variáveis selecionadas e a importância das mesmas (escala *eigenvalue*) na variância e separação dos grupos.

### 3.3.4 DISCUSSÃO

A análise convencional do sêmen é um dos principais critérios para a avaliação e predição de padrões de fertilidade em várias espécies, incluindo a bovina. No entanto, os resultados das análises realizadas no presente estudo demonstram que não houve diferença entre os grupos na maior parte das análises realizadas de forma rotineira em avaliações de qualidade seminal ou, quando observadas, tais diferenças se encontram dentro dos padrões seminais considerados recomendáveis. Entre estes, os resultados mostram que não houve diferença entre os grupos no que se refere à concentração e motilidade. Em relação à morfologia espermática, os grupos de baixa fertilidade apresentaram mais defeitos totais, com Angus de baixa fertilidade com mais defeitos maiores e, Nelore de baixa fertilidade mais defeitos menores. No entanto, é importante salientar que, apesar da diferença, a porcentagem de células espermáticas com defeitos se encontra dentro

do padrão considerado aceitável para bovinos de acordo com normas de entidades regulamentadoras, como o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). Estes resultados corroboram com estudos e revisões publicados sobre análises seminais em diferentes espécies que afirmam que, apesar da importância das análises convencionais, elas são insuficientes para associar a qualidade seminal com padrão de fertilidade, havendo a necessidade da aplicação de avaliações menos subjetivas e mais eficientes (BARTH e OKO, 1989; AITKEN, 2006; WANG e SWERDLOFF, 2014).

Considerando-se a necessidade de menor subjetividade e maior eficiência, vale destacar que as avaliações por meio da análise computadorizada da cinética espermática (CASA) vão muito além do parâmetro motilidade. O estudo da cinética do sêmen de touros pode, por exemplo, fornecer informações adicionais sobre a viabilidade dos espermatozoides no trato reprodutivo da fêmea, havendo estudos recentes sobre a associação de parâmetros da cinética espermática com hiperativação precoce de espermatozoides e padrões de fertilidade (SHOJAEI, KROETSCH, *et al.*, 2012; ANDRADE, MOREIRA, *et al.*, 2018). Nos resultados de cinética espermática deste estudo, pode-se ressaltar que os animais do grupo Angus de baixa fertilidade apresentaram maior amplitude do movimento lateral da cabeça (ALH), maior frequência de batimento de flagelo (BCF) e menor linearidade de movimento (LIN) em comparação com o grupo correspondente de alta fertilidade. Tais diferenças cinéticas podem apontar para uma possível hiperativação precoce, o que poderia resultar em queda na taxa de fertilidade, considerando-se o tempo transcorrido entre a IA e o momento de ovulação das fêmeas (ANDRADE, MOREIRA, *et al.*, 2018). Os resultados de cinética mostram ainda que os animais do grupo Angus de alta fertilidade possuem maior retilinearidade de movimento e maior linearidade. Por outro lado, os animais da raça Nelore tiveram maior velocidade média, linear e curvelinear. É possível que estes parâmetros de cinética espermática também interfiram no potencial fecundante destes touros em programas de IATF, considerando-se diferenças no momento de ovulação das vacas do lote inseminado. No entanto, há ainda a necessidade de se conduzir mais estudos visando estabelecer uma relação mais precisa entre a cinética espermática e fertilidade.

A análise funcional de estruturas celulares do espermatozoide também contribui de forma significativa para uma melhor avaliação de padrões de fertilidade (AITKEN, 2006; BLUMER, RESTELLI, *et al.*, 2012). Entre os atributos funcionais, o

papel da mitocôndria deve ser destacado, considerando-se sua importância na funcionalidade e metabolismo das células espermáticas. Danos causados a esta organela durante o processo de criopreservação pode levar a um desequilíbrio no *status* oxidativo pela maior liberação de EROs (GALLON, MARCHETTI, *et al.*, 2006; AMARAL, LOURENÇO, *et al.*, 2013; LOSANO, ANGRIMANI, *et al.*, 2018). Os resultados mostram que os touros Angus de baixa fertilidade apresentaram maior porcentagem de células espermáticas com potencial de membrana mitocondrial médio e baixo. É importante salientar que estes resultados estão associados com alta atividade mitocondrial. Enquanto o potencial de membrana mitocondrial está relacionado com a diferença na concentração de prótons ( $H^+$ ) entre a matriz mitocondrial e o espaço intermembranas, a atividade mitocondrial se refere ao transporte de elétrons no complexo enzimático da cadeia respiratória, para que a síntese de ATP ocorra de forma adequada. Estudos anteriores indicam que uma redução no potencial de membrana mitocondrial, pode levar a uma elevação na frequência de transporte de elétrons por um mecanismo compensatório, pelo qual o complexo mitocondrial bombeia mais prótons para o espaço intermembrana para tentar restabelecer o potencial de membrana (LOSANO, ANGRIMANI, *et al.*, 2017; LOSANO, ANGRIMANI, *et al.*, 2018). A análise de correlação no grupo Angus de baixa fertilidade indica que quanto menor o potencial de membrana mitocondrial, maior o índice de atividade mitocondrial. Portanto, os resultados verificados neste grupo corroboram o fato de que a alta atividade mitocondrial pode estar relacionada com o mecanismo para compensar o menor potencial de membrana mitocondrial. Esse mecanismo pode resultar em uma alteração da homeostase oxidativa das células espermáticas (CALDEIRA DA SILVA, CERQUEIRA, *et al.*, 2008; KOPPERS, DE IULIIS, *et al.*, 2008), o que também foi observado neste grupo.

Vários estudos demonstram a relação entre o *status* funcional da mitocôndria e seu impacto na homeostase oxidativa (MARCHETTI, OBERT, *et al.*, 2002; AITKEN e CURRY, 2011; AMARAL, LOURENÇO, *et al.*, 2013; AITKEN, 2017). Alterações funcionais da mitocôndria podem causar um quadro de toxicidade prejudicial não apenas ao espermatozoide afetado, mas também aos demais que estão ao seu redor. Tal toxicidade é causada pelo acúmulo excessivo de EROs, considerando-se que a mitocôndria é o principal sítio de formação de EROs intracelular, e consequente estresse oxidativo (LOSANO, ANGRIMANI, *et al.*, 2018). De fato, o grupo Angus de baixa fertilidade, além das alterações no *status* mitocondrial citadas

acima, apresentou maior presença de EROs e maior suscetibilidade à peroxidação lipídica, em comparação com o grupo Angus de alta fertilidade. Os resultados de PCA corroboram esses achados, indicando que as variáveis do estado mitocondrial e do estresse oxidativo têm um grande efeito na variância observada e na separação entre Angus de baixa e alta fertilidade. Além disso, os resultados de correlação indicam que o alto índice de atividade mitocondrial está relacionado ao baixo potencial de membrana mitocondrial e a uma maior suscetibilidade à peroxidação lipídica. É importante salientar ainda que uma maior concentração de EROs foi observada na raça Angus em comparação com a Nelore. Tais resultados corroboram com estudos que demonstram que touros de genética europeia (*Bos taurus*) são mais suscetíveis ao estresse térmico e consequente estresse oxidativo (NICHI, BOLS, *et al.*, 2006; NICHI, GOOVAERTS, *et al.*, 2007; TRAORÉ, MARKEMANN, *et al.*, 2017), e podem ser indicativos de uma maior suscetibilidade ao desbalanço oxidativo causado pelo processo de criopreservação seminal (BILODEAU, CHATTERJEE, *et al.*, 2000).

Embora as EROs sejam essenciais em diversos processos fisiológicos do espermatozoide, como a hiperativação e capacitação espermáticas, reação acrossomal e ligação à zona pelúcida (DE LAMIRANDE, JIANG, *et al.*, 1997; AITKEN, RYAN, *et al.*, 2004; GADELLA, TSAI, *et al.*, 2008; AITKEN, 2017), um quadro de estresse oxidativo pode causar danos estruturais a vários componentes celulares. As EROs, por serem altamente reativas, podem afetar a própria mitocôndria, membranas e causar alterações moleculares, como fragmentação do DNA e alteração estrutural de lipídeos, carboidratos e proteínas, com elevado impacto no *status* funcional dos espermatozoides (VERNET, AITKEN e DREVET, 2004; LAYEK, MOHANTY, *et al.*, 2016; LOSANO, ANGRIMANI, *et al.*, 2018). Em relação à membrana plasmática, os resultados mostram que os animais de alta fertilidade possuem maior porcentagem de células com membrana íntegras em comparação com os de baixa fertilidade. Os resultados de correlação do grupo Angus de baixa fertilidade mostram ainda que a maior presença de EROs está relacionada com menor integridade de membrana plasmática. Estes resultados corroboram com o fato de que uma maior concentração de EROs e uma maior suscetibilidade à peroxidação lipídica, observada nos Angus de baixa fertilidade, podem causar mais danos à membrana, especialmente levando-se em consideração que a membrana do espermatozoide possui uma composição complexa e dinâmica,

necessária para a fecundação do oócito (FLESH e GADELLA, 2000; GADELLA, TSAI, *et al.*, 2008; WASSALL e STILLWELL, 2009; MANDAL, BADIYAKAR e CHAKRABARTY, 2014).

Os resultados observados neste estudo demonstram que o grupo Angus de baixa fertilidade é mais suscetível à fragmentação de DNA em comparação ao Angus de alta fertilidade. Os resultados de correlação também demonstram que o estresse oxidativo está relacionado com danos à cromatina espermática nos dois grupos de baixa fertilidade. A fragmentação de cromatina causada pela ação de EROs é considerada a mais significativa, com aumento na fragmentação de fita simples e dupla do DNA (AITKEN e CURRY, 2011; SIMÕES, FEITOSA, *et al.*, 2013; LOSANO, ANGRIMANI, *et al.*, 2018). Em relação à raça, os resultados demonstram que as amostras de touros Nelore apresentam uma suscetibilidade maior à fragmentação da cromatina, em comparação com Angus. É importante salientar, no entanto, que a técnica utilizada no presente estudo é de indução por ácido e pode apenas indicar maior ou menor suscetibilidade. Considerando-se o impacto de alterações na estrutura de cromatina espermática na fecundação e subsequente desenvolvimento embrionário (EVENSON e JOST, 2000; SIMÕES, FEITOSA, *et al.*, 2013; LOSANO, ANGRIMANI, *et al.*, 2018), há necessidade de uso de outras técnicas para uma melhor análise destas diferenças encontradas entre as raças e melhor avaliação da presença ou não de danos na cromatina espermática.

A associação de técnicas para a análise do *status* funcional e oxidativo de touros com alta e baixa fertilidade, a partir de histórico de IATF, e das raças Angus (*Bos taurus*) e Nelore (*Bos indicus*), utilizada neste estudo, demonstra a importância da avaliação e correlação entre as diferentes funções espermáticas. Os resultados demonstram que a análise convencional, por si só, não é suficiente para identificar mecanismos envolvidos em problemas de fertilidade. No entanto, as análises funcionais demonstraram a presença de uma relação importante entre problemas mitocondriais, estresse oxidativo e danos às estruturas espermáticas, especialmente em animais de baixa fertilidade da raça Angus, levando-se em consideração a alta demanda de sêmen desta raça europeia em programas de melhoramento genético na pecuária de corte.

### **3.4 EXPERIMENTO 1.2 - ANÁLISE LIPIDÔMICA E METABOLÔMICA DE TOUROS COM TAXAS DE FERTILIDADE DISTINTAS**

Os resultados observados no Experimento 1.1, com importantes diferenças entre os grupos analisados, principalmente no que se refere à atividade e potencial de membrana mitocondriais e capacidade de resposta ao estresse oxidativo, corroboram com a hipótese de que existem diferenças nos perfis lipídico e metabólico em touros com diferentes taxas de fertilidade, bem como entre as diferentes raças analisadas. As avaliações moleculares são essenciais para melhor compreensão dos mecanismos, estrutura e vias funcionais relacionadas ao padrão de fertilidade de espermatozoides. Além disso, a identificação das diferenças entre esses animais pode contribuir para a identificação de marcadores moleculares relacionados à maior ou menor fertilidade em touros utilizados em programas de IA e IATF.

#### **3.4.1 MATERIAL E MÉTODOS**

Este estudo foi conduzido de acordo com as normas éticas para o uso de animais e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (protocolo nº 2054100717).

##### **3.4.1.1 Delineamento Experimental**

O delineamento do Experimento 1.2 é o mesmo que o experimento 1.1 (tópico 3.3.2.1, Figura 1). As análises moleculares também foram realizadas em quatro partidas distintas por animal, com 10 touros da raça Angus (Aa) e 11 touros da raça Nelore (Na) compondo o grupo de alta fertilidade, e 10 touros Angus (Ab) e sete touros Nelore (Nb) constituindo o grupo de baixa fertilidade ( $n=152$  amostras, sendo, Aa:  $n=40$ ; Na:  $n=44$ ; Ab:  $n=40$ ; Nb:  $n=28$ ). Os resultados das análises foram submetidos a um arranjo fatorial 2x2, onde um dos fatores é a taxa de fertilidade (alta e baixa) e o outro fator é constituído de raça (Angus e Nelore).

##### **3.4.1.2 Análises Moleculares**

As análises moleculares foram realizadas por meio de parceria entre o Laboratório de Andrologia do Departamento de Reprodução Animal – FMVZ USP e o laboratório de análises moleculares da *startup* IonMedicine, externa à USP (Anexo



2) e com o laboratório do Centro de Espectrometria de Massas Aplicada - CEMSA. A menos que indicado, os reagentes usados nas análises deste estudo foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, E.U.A.).

#### **3.4.1.2.1 Preparação das amostras**

As amostras das partidas de sêmen criopreservado foram submetidas a um protocolo desenvolvido para a separação das células espermáticas do diluidor, visando evitar a seleção de células espermáticas bem como a perda das mesmas durante o processo. A validação deste protocolo foi realizada por análises subsequentes do *pellet* de células espermáticas pelo sistema CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*), para avaliar a condição das células, e pela leitura da concentração de células no *pellet* e no sobrenadante com câmara de Neubauer. O protocolo utiliza PBS livre de cálcio e magnésio (tampão fosfato-salino) e Percoll® (gradiente de densidade). Após a descongelação de cada palheta com a partida de sêmen (por 30 segundos a 37°C), o volume total foi colocado em microtubo de 1,5 mL, mantido em banho seco a 37°C. Em seguida, o sêmen foi pipetado e colocado, cuidadosamente pela parede do tubo, em um segundo microtubo de 1,5 mL sobre 800 µL de gradiente único de Percoll 45% (PBS 10x para o Percoll 90%; e nova diluição em PBS 1x para o Percoll 45%, 1:1). O mesmo foi submetido à centrifugação (37°C, 3300G, 5 min) e, após a mesma, a fração superior com o diluidor foi removida cuidadosamente. Em seguida, com a troca da ponteira da pipeta, o *pellet* de espermatozoides foi recuperado e colocado em um novo microtubo de 1,5 mL. O mesmo foi ressuscitado em 1mL de PBS para lavagem por meio de nova centrifugação (37°C, 1000G, 3 min), para remover quaisquer resquícios do diluidor. Por fim, o *pellet* de espermatozoides foi recuperado e mantido em microtubo de 1,5mL em banho seco a 37°C. Após a leitura da concentração final do *pellet*, cada amostra foi separada em replicatas com concentração final fixa de  $3 \times 10^6$  espermatozoides/mL e volume fixo de 200 µL de PBS em microtubos de 500 µL. As replicatas (três para cada amostra) foram armazenadas a -80°C até o momento de preparação das mesmas para extração de lipídios e metabólitos. Antes do momento de extração, as amostras foram submetidas a um protocolo para a lise das células espermáticas por meio de três repetições de *snap-freezing* (método de congelamento instantâneo) em nitrogênio líquido por 30 segundos. Após o *snap-freezing*, as amostras foram levadas a banho ultrassônico a 37°C por 30 min. Ao

final deste processo as mesmas foram submetidas ao processo de extração de metabólitos.

#### **3.4.1.2.2 Extração lipídica e de metabólitos**

Para a extração de metabólitos (incluindo lipídios), foram testados os protocolos *Bligh and Dyer* (BLIGH e DYER, 1959), metanol (MeOH + 1% Ácido Fórmico; v/v) e acetonitrila (CH<sub>3</sub>CN + 1% Ácido Fórmico; v/v). As avaliações e validações dos protocolos de extração foram realizadas por meio de HPLC-MS/MS (LCMS-8060 CL®, Shimadzu Corporation, Japão). O protocolo selecionado, com a obtenção das melhores leituras no equipamento, foi o da extração com acetonitrila e ácido fórmico (1%). Antes do início do processo de extração, as amostras de células espermáticas lisadas (células + PBS) foram agitadas em *vortex* por 1 min. A extração foi realizada em placas com 96 poços, com 200 µL de amostra em cada poço e adição de 400 µL da solução de extração. A placa com as amostras foi agitada em *vortex* por 5 min e mantida em repouso em refrigeração (5°C) por 10 min. Na sequência, a placa foi centrifugada a 5°C por 15 min e, ao término do ciclo, foi feita a recuperação de 100 µL do sobrenadante de cada amostra e transferência para uma nova placa. Nesta, o sobrenadante das amostras foi diluído em água ultrapura (100µL de amostra e 100µL de água Milli-Q®; 1:1) e a mesma foi inserida no equipamento para injeção no sistema HPLC-MS/MS.

#### **3.4.1.2.3 Análise do perfil lipídico e metabólico de espermatozoides**

A análise de lipídios e metabólitos das amostras espermáticas foi realizada no sistema de métodos *target*, os quais utilizam padrões internos deuterados (PID) que permitem a identificação e quantificação de metabólitos. As amostras foram analisadas no equipamento LCMS-8060 CL® (Shimadzu Corporation, Japão) com o sistema cromatográfico Nexera CL, composto por degaseificador, duas bombas unitárias, auto-injetor, forno de coluna e módulo controlador. Tal sistema é acoplado ao espectrômetro de massas com analisador do tipo triplo-quadrupolo. A fase móvel utilizada era composta de acetonitrila, água Milli-Q® e ácido fórmico grau LC-MS (Merck & Co, E.U.A.). Todas as análises foram feitas com injeção de 5 µL de amostra e ionização por eletrospray (ESI), em modo positivo ou negativo a depender do analito e argônio como gás do sistema. As detecções foram feitas no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM).

Para a análise *target*, foram adicionados à solução de extração PID dos metabólitos analisados (*mix* de PID, 100 ng/mL). Além das amostras de células espermáticas do presente estudo, foram incluídas em cada placa amostras controle (PBS + solução de extração; PBS + solução de extração + *mix* PID; solução de extração + *mix* PID; pool de amostras de espermatozoides + solução de extração + *mix* PID; com três replicatas de cada controle). Após o mapeamento e preparo das placas, as mesmas foram inseridas no equipamento, no qual são mantidas a 10°C, durante o processo de injeção e análise.

Foram utilizados três métodos diferentes, de modo a contemplar diferentes classes de moléculas. Os métodos utilizados foram: metabólitos primários (total de 100 metabólitos, os quais abrangem aminoácidos, ácidos orgânicos, nucleosídeos, nucleotídeos e derivados); mediadores lipídicos (12 metabólitos de cadeias de ácidos graxos); lipídios (40 metabólitos, abrangendo as classes de esfingosinas, esfingomielinas, lisofosfatidilcolinas, glicerofosfocolinas e fosfatidilcolinas) e carnitinas (11 metabólitos). Os dois primeiros métodos foram adquiridos junto à Shimadzu e o terceiro desenvolvido na IonMedicine (*in house*). No método de metabólitos primários foram utilizadas fases móveis de água ultrapura + 0,1% de ácido fórmico (v/v) (A) e solução de acetonitrila + 0,1% de ácido fórmico (v/v) (B), com uma coluna de fase reversa do tipo PFPP (pentafluorofenilpropil - 3 µm, 150 mm x 2.1 mm, Supelco) aquecida a 40° C. O fluxo aplicado foi de 0,25 mL/min e o gradiente referente ao solvente B foi: 0 min, 0%; 1 min, 0%; 2 min, 25%; 11 min, 35%; 15 min, 95%; 20 min, 95%; 20,1 min, 0% 25 min, 0%, totalizando 25 min de análise. Para o método de mediadores lipídicos foram utilizadas fases móveis de água ultrapura + 0,1% de ácido fórmico (v/v) (A) e acetonitrila (v/v) (B), com uma coluna de fase reversa do tipo C8 (2,6 µm, 150 mm x 2.1 mm, Phenomenex) aquecida a 40° C. O fluxo aplicado foi de 0,4 mL/min e o gradiente referente ao solvente B foi: 0 min, 10%; 5 min, 25%; 10 min, 35%; 20 min, 75%; 20,1 min, 95%; 25 min, 95%; 25,1 min, 0% 28 min, 0%, totalizando 28 min de análise. O método de lipídios e carnitinas foi desenvolvido a partir do método de mediadores lipídicos, utilizando a mesma fase móvel e coluna. A temperatura de forno utilizada foi de 70°C. O gradiente referente ao solvente B foi: 0 min, 5%; 8 min, 60%; 20 min, 80%; 21 min, 98%; 26 min, 98%; 26,1 min, 5%; 28 min, 5%, totalizando 28 min de análise. Este método também lança mão de um gradiente de fluxo, tendo vazão inicial de

0,45 mL/min até 19 min, subindo para 0,55 mL/min de 19 a 19,5 min, e retornando para 0,45 mL/min de 27 a 27,5 min.

A análise de quantificação de colesterol foi feita em equipamento 3200 QTRAP (Siex, Danaher Corporation, E.U.A.) utilizando PID (PHR1533), com fases móveis de água ultrapura + 0,1% de ácido fórmico (v/v) (A) e solução de acetonitrila + 0,1% de ácido fórmico (v/v) (B), com uma coluna de fase reversa do tipo C8 (Luna - 3 µm, 50x2 mm, 100 Å, Phenomenex) aquecida a 35° C. O fluxo aplicado foi de 0,4 mL/min e o gradiente referente aos solventes A e B foi em 0 min e 4 min, 10% e 90% respectivamente, totalizando 4 min de análise.

#### **3.4.1.2.4 Análise Estatística**

Dados de espectrometria obtidos pelo método *target* permitem uma análise quantitativa dos metabólitos analisados. Para tal, inicialmente, as áreas dos picos de cada metabólito obtidas pela espectrometria, foram normalizadas pelo PID. Esta normalização foi feita pela média das áreas das amostras controle contendo PBS, solução de extração e mix de padrões internos específicos para os metabólitos de cada método analisado. Após a normalização, os resultados de cada metabólito foram quantificados, com a conversão em valores absolutos em ng/mL, a partir da concentração em ng/mL do PID (para carnitinas, lipídios, mediadores lipídicos e parte de metabólitos primários). Metabólitos primários detectados sem PID próprio tiveram as áreas dos picos normalizadas pela área de outro PID (Sulfona de metionina para aminoácidos e Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico – 2NMES, para outros metabólitos), com os resultados sendo apresentados em *area ratio*.

Os resultados das análises, em ng/mL ou *area ratio*, foram primeiramente analisados seguindo o arranjo fatorial 2x2 (fertilidade: alta e baixa; raça: Angus e Nelore) pelo programa *SAS System for Windows* (SAS Institute Inc., Cary, NC, E.U.A.), para análise de interação e diferença entre os grupos conforme descrito em 3.3.2.2.5. Os resultados, todos paramétricos (com e sem transformação), foram divididos em classes de metabólitos e são apresentados nas tabelas em médias (não transformadas) ± erro padrão da média.

Os dados foram ainda analisados pelo sistema em R do *MetaboAnalyst 5.0* (XIA e WISHART, 2016; PANG, CHONG, *et al.*, 2021) e pelo programa *Past 4.0* (HAMMER, HARPER e AND RYAN, 2001), compreendendo análises univariadas e multivariadas. As análises realizadas no *MetaboAnalyst* foram feitas, inicialmente

com os quatro grupos e, em seguida, separadamente por raça (Aa vs Ab, Na vs Nb). Os dados foram normalizados por transformação (log, raiz quadrada ou cúbica) e escala (automática, Pareto ou centralização pela média). Análises de *fold change* e correlação ( $r > 0,9$ ) foram realizadas de forma complementar para uma pré-seleção das variáveis submetidas às análises de componentes principais (PCA) e discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA), esta última utiliza um método de classificação supervisionado que considera dados conhecidos dos grupos no momento de separação das amostras. PCA e PLS-DA foram utilizadas para verificação de diferenças globais entre os grupos e identificação de variáveis com maior contribuição significativa, considerando-se valores de *loadings* e *VIP score* (variáveis importantes em projeção). *Loadings* maiores (positivos ou negativos) indicam que uma variável tem um forte efeito naquele componente principal, enquanto valores positivos e negativos indicam que uma variável e um componente principal estão positivamente ou inversamente correlacionados, respectivamente. Os valores de *VIP score* também indicam a importância das variáveis para a separação dos grupos analisados. Os dados foram submetidos novamente à PCA no programa Past (usando a mesma metodologia, sem alteração dos resultados obtidos pelo MetaboAnalyst), para obtenção de gráfico de PCA-*biplot* (amostras e variáveis). Neste, as amostras são apresentadas em *clusters* circundados por elipses de intervalo de confiança de 95% (IC), enquanto as variáveis são apresentadas com escala *eigenvalue* (conjunto especial de escalares associados a um sistema linear de equações), a qual indica importância e peso das principais variáveis nos grupos analisados. Os resultados das análises multivariadas foram utilizados para a seleção de metabólitos de cada classe e para cada grupo para análise de correlação, a qual foi feita pelo teste de Spearman com dados não transformados, classificados por grupo (Aa, Na, Ab, Nb) e com ranqueamento dos resultados. Adicionalmente, foi feita análise de potenciais biomarcadores pela análise multivariada e univariada de curva ROC (*receiver operating characteristic* - característica de operação do receptor) e o teste dos mesmos, no MetaboAnalyst Tester.

### 3.4.2 RESULTADOS

Os resultados são apresentados por classe de metabólitos. Em cada classe há tabelas com resultados de interação (valores de  $P$ ) e, na presença de interação (fertilidade\*raça), tabelas do efeito do grupo genético (Angus e Nelore) sobre a fertilidade (alta e baixa) e da fertilidade sobre os grupos genéticos. Para as variáveis sem interação, as tabelas são divididas em efeito fertilidade e efeito raça. Estas tabelas apresentam os resultados em médias  $\pm$  erro padrão da média (SEM) e valores de  $P$ . As médias são apresentadas sem transformação. Os gráficos de diferenças entre os grupos são apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartis, limites máximo e mínimo, média e valor de  $P$ . Os resultados de PCA e PLS-DA são apresentados em gráficos (*score plots*, *VIP score* e *biplot*). As tabelas com a porcentagem de variância dos componentes principais e valores de *loadings* das análises (PCA e PLS-DA) estão disponíveis no Apêndice 3. Informações utilizadas na descrição dos metabólitos nos resultados abaixo foram obtidas nos bancos de dados do PubChem (KIM, CHEN J, *et al.*, 2021) e DAVID (HUANG, SHERMAN e LEMPICKI, 2009; HUANG, SHERMAN e LEMPICKI, 2009).

#### 3.4.2.1 Lipídios

Entre o total de 53 lipídios analisados pelo método target (12 metabólitos de cadeias de ácidos graxos e 41 lipídios abrangendo as classes de esfingosinas, esfingomielinas, lisofosfatidilcolinas, glicerofosfocolinas e fosfatidilcolinas e colesterol), 29 lipídios foram detectados na análise de HPLC-MS/MS das amostras de células espermáticas. Os resultados das classes lipídicas abrangem as diferenças entre os grupos estudados (Aa, Ab, Na e Nb) obtidas pela análise fatorial e as análises multivariadas de PCA e PLS-DA, os quais são apresentados abaixo em dois tópicos distintos.

##### 3.4.2.1.1 Resultados de interação e diferenças entre os grupos

A maior parte dos lipídios detectados apresentou interação (Tabela 6), ou seja, efeito do grupo genético sobre a fertilidade (Tabela 7) e efeito da fertilidade sobre os grupos genéticos (Tabela 8). Não houve interação em apenas quatro lipídios, com resultados apresentados em efeito fertilidade (Tabela 9) e efeito raça (Tabela 10).

Tabela 6 - Resultados da análise de interação de fertilidade (alta vs baixa) e raça (Angus vs Nelore) de lipídios analisados em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado

CLASSE	LIPÍDIO	Valores de <i>P</i>		
		RAÇA	FERTILIDADE	RAÇA*FERTILIDADE
Esterol	Colesterol	0,2536	0,1086	0,0024
Ácido graxo	Ácido docosahexaenóico (DHA)	<,0001	0,0002	0,1808
Lisofosfolípido	Liso-PAF C-16	<,0001	0,0035	0,0837
Esfingosina	Sph(d14:1)	0,0141	0,4351	<,0001
Esfingosina	Sph(d16:0)	0,0389	0,2075	0,002
Esfingomielina	SM(d18:1/16:1)	<,0001	0,0012	<,0001
Esfingomielina	SM(d18:1/16:0)	<,0001	<,0001	0,001
Esfingomielina	SM(d18:1/18:0)	0,7958	<,0001	0,0002
Esfingomielina	SM(d18:1/24:1(15Z))	0,0018	<,0001	<,0001
Esfingomielina	SM(d18:1/24:0)	0,169	<,0001	<,0001
Esfingomielina	SM(d18:1/18:1(9Z))	VARIÁVEL APENAS PARA RAÇA		
Lisofosfatidilcolina	LPC(17:1(10Z)/0:0)	<,0001	<,0001	<,0001
Lisofosfatidilcolina	LPC(16:0/0:0)	<,0001	0,0008	0,0010
Lisofosfatidilcolina	LPC(18:1)	<,0001	<,0001	0,0179
Lisofosfatidilcolina	LPC(18:0)	<,0001	<,0001	<,0001
Fosfatidilcolina	PC(16:1(9Z)/16:1(9Z))	<,0001	<,0001	0,0403
Fosfatidilcolina	PC(16:0/14:0)	0,0023	<,0001	0,0033
Fosfatidilcolina	PC(18:1(9Z)/14:0)	0,8487	<,0001	<,0001
Fosfatidilcolina	PC(38:6)	0,053	0,0131	0,0012
Fosfatidilcolina	PC(20:4/16:0)	<,0001	<,0001	<,0001
Fosfatidilcolina	PC(16:0/18:2(9Z,12Z))	<,0001	<,0001	<,0001
Fosfatidilcolina	PC(18:0/14:0)	<,0001	0,0001	<,0001
Fosfatidilcolina	PC(18:0/22:6)	0,0022	0,0093	<,0001
Fosfatidilcolina	PC(18:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	0,8269	0,0011	<,0001
Fosfatidilcolina	PC(18:0/18:2(9Z,12Z))	0,9838	0,0073	<,0001
Fosfatidilcolina	PC(17:0/17:0)	<,0001	<,0001	0,0107
Fosfatidilcolina	PC(18:1(9Z)/18:0)	<,0001	<,0001	<,0001
Fosfatidilcolina	PC(19:0/19:0)	VARIÁVEL APENAS PARA FERTILIDADE		
Fosfatidilcolina	PC(13:0/13:0)	0,4711	<,0001	0,5902

Fonte: Leite (2022)

Valores de  $P < 0,1$  foram considerados como interação entre os fatores e são apresentados em vermelho.

Tabela 7 - Efeito do grupo genético (Angus e Nelore) sobre a fertilidade (alta e baixa) de lipídios analisados em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado

LIPÍDIOS Concentração (ng/mL)	ALTA FERTILIDADE		P	BAIXA FERTILIDADE		P
	ANGUS (n=40)	NELORE (n=44)		ANGUS (n=40)	NELORE (n=28)	
	Média±SEM	Média±SEM		Média±SEM	Média±SEM	
Colesterol	3063,25±222,77	3861,2±162,52	0,0044	4362,78±291,05	3468,41±198,34	0,0236
Liso-PAF C-16	1270,62±80,03	1670,18±139,20	0,0282	938,39±68,75	1436,18±120,17	<,0001
Sph(d14:1)	5,76±0,39	7,10±0,37	0,0244	8,60±0,70	4,98±0,37	0,0003
Sph(d16:0)	0,053±0,004	0,074±0,005	0,0006	0,059±0,004	0,052±0,002	0,373
SM(d18:1/16:1)	22,26±2,12	19,86±2,36	0,0978	6,38±0,92	28,06±2,78	<,0001
SM(d18:1/16:0)	2005,28±233,50	794,62±88,57	<,0001	555,72±58,12	424,66±64,71	0,0428
SM(d18:1/18:0)	57,45±5,14	43,75±4,71	0,004	18,75±1,93	25,78±2,61	0,0103
SM(d18:1/24:1(15Z))	59,23±2,93	38,13±2,67	<,0001	25,16±1,63	26,80±1,92	0,4833
SM(d18:1/24:0)	135,17±10,82	84,16±6,83	<,0001	40,95±3,55	55,14±5,49	0,0039
LPC(17:1(10Z)/0:0)	0,219±0,030	0,100±0,008	<,0001	0,113±0,009	0,038±0,002	<,0001
LPC(16:0/0:0)	295,72±15,64	94,71±9,50	<,0001	185,31±10,60	91,43±9,70	<,0001
LPC(18:1)	120,45±15,43	26,71±2,57	<,0001	58,97±4,84	22,09±2,06	<,0001
LPC(18:0)	102,57±7,32	27,24±2,68	<,0001	37,50±3,82	22,99±3,37	0,0008
PC(16:1(9Z)/16:1(9Z))	1113,42±117,83	202,47±19,53	<,0001	134,83±16,92	77,08±21,05	0,0001
PC(16:0/14:0)	355,54±32,65	378,23±35,27	0,9185	112,42±11,75	186,47±20,35	0,0004
PC(18:1(9Z)/14:0)	240,95±25,11	153,82±20,65	0,0006	60,38±8,68	151,24±42,95	0,0058
PC(38:6)	1362,17±193,33	1679,91±322,07	0,2875	698,69±111,15	1329,31±236,70	0,0004
PC(20:4/16:0)	2276,42±335,39	1881,34±241,17	0,1253	395,64±71,46	2540,49±340,52	<,0001
PC(16:0/18:2(9Z,12Z))	6663,43±681,05	3663,93±420,70	0,0001	1003,43±118,02	5783,30±792,51	<,0001
PC(18:0/14:0)	263,79±27,83	91,21±11,33	<,0001	109,10±9,95	91,65±11,63	0,1261
PC(18:0/22:6)	893,33±74,69	453,33±75,16	<,0001	453,52±55,23	516,09±68,68	0,2994
PC(18:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	2329,94±288,99	1291,27±184,72	<,0001	812,16±121,02	1923,03±327,61	0,0003
PC(18:0/18:2(9Z,12Z))	5033,13±730,24	2621,66±300,96	0,0006	1905,71±231,78	3057,06±293,30	0,0004
PC(17:0/17:0)	24,09±1,96	14,17±1,19	<,0001	12,01±0,83	10,06±0,61	0,1555
PC(18:1(9Z)/18:0)	1940,83±100,32	539,58±48,85	<,0001	475,95±58,71	595,06±60,17	0,0351

Fonte: Leite (2022)

Resultados em média ± SEM e valor de P. Valores de P<0,05, são apresentados em vermelho. Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.



Tabela 8 - Efeito da fertilidade (alta e baixa) sobre os grupos genéticos (Angus e Nelore) de lipídios analisados em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado

LIPÍDIOS Concentração (ng/mL)	ANGUS		P	NELORE		P
	ALTA FERTILIDADE (n=40)	BAIXA FERTILIDADE (n=40)		ALTA FERTILIDADE (n=44)	BAIXA FERTILIDADE (n=28)	
	Média±SEM	Média±SEM		Média±SEM	Média±SEM	
Colesterol	3063,25±222,77	4362,78±291,05	0,0007	3861,2±162,52	3468,41±198,34	0,132
Liso-PAF C-16	1270,62±80,03	938,39±68,75	0,0008	1670,18±139,20	1436,18±120,17	0,3964
Sph(d14:1)	5,76±0,40	8,60±0,70	0,0015	7,10±0,37	4,98±0,37	0,0012
Sph(d16:0)	0,0531±0,0042	0,059±0,004	0,1952	0,074±0,005	0,052±0,002	0,0005
SM(d18:1/16:1	22,26±2,12	6,38±0,92	<,0001	19,86±2,36	28,06±2,78	0,0028
SM(d18:1/16:0	2005,28±233,50	555,72±58,12	<,0001	794,62±88,57	424,66±64,71	<,0001
SM(d18:1/18:0)	57,45±5,14	18,75±1,93	<,0001	43,75±4,71	25,78±2,61	0,0086
SM(d18:1/24:1(15Z))	59,23±2,93	25,16±1,63	<,0001	38,13±2,67	26,80±1,92	0,0107
SM(d18:1/24:0)	135,17±10,82	40,95±3,55	<,0001	84,16±6,83	55,14±5,49	0,0015
LPC(17:1(10Z)/0:0)	0,219±0,030	0,113±0,009	0,0003	0,100±0,008	0,038±0,002	<,0001
LPC(16:0/0:0)	295,72±15,64	185,31±10,60	<,0001	94,71±9,50	91,43±9,70	0,9763
LPC(18:1)	120,45±15,43	58,97±4,84	<,0001	26,71±2,57	22,09±2,06	0,0978
LPC(18:0)	102,57±7,32	37,50±3,82	<,0001	27,24±2,68	22,99±3,37	0,1070
PC(16:1(9Z)/16:1(9Z))	1113,42±117,83	134,83±16,92	<,0001	202,47±19,53	77,08±21,05	<,0001
PC(16:0/14:0)	355,54±32,65	112,42±11,75	<,0001	378,23±35,27	186,47±20,35	<,0001
PC(18:1(9Z)/14:0)	240,95±25,11	60,38±8,68	<,0001	153,82±20,65	151,24±42,95	0,4115
PC(38:6)	1362,17±193,33	698,69±111,15	<,0001	1679,91±322,07	1329,31±236,70	0,5610
PC(20:4/16:0)	2276,42±335,39	395,64±71,46	<,0001	1881,34±241,17	2540,49±340,52	0,0268
PC(16:0/18:2(9Z,12Z))	6663,43±681,05	1003,43±118,02	<,0001	3663,93±420,70	5783,30±792,51	0,0098
PC(18:0/14:0)	263,79±27,83	109,10±9,95	<,0001	91,21±11,33	91,65±11,63	0,6635
PC(18:0/22:6)	893,33±74,69	453,52±55,23	<,0001	453,33±75,16	516,09±68,68	0,1707
PC(18:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	2329,94±288,99	812,16±121,02	<,0001	1291,27±184,72	1923,03±327,61	0,1028
PC(18:0/18:2(9Z,12Z))	5033,13±730,24	1905,71±231,78	<,0001	2621,66±300,96	3057,06±293,30	0,0943
PC(17:0/17:0)	24,09±1,96	12,01±0,83	<,0001	14,17±1,19	10,06±0,61	0,0107
PC(18:1(9Z)/18:0)	1940,83±100,32	475,95±58,71	<,0001	539,58±48,85	595,06±60,17	0,3397

Fonte: Leite (2022)

Resultados em média ± SEM e valor de P. Valores de P<0,05, são apresentados em vermelho. Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

Tabela 9 - Efeito fertilidade (alta e baixa) de lipídios analisados em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado

LIPÍDIOS Concentração (ng/mL)	ALTA FERTILIDADE (n=84)	BAIXA FERTILIDADE (n=68)	P
	Média±SEM	Média±SEM	
Ácido docosahexaenóico (DHA)	35,36±1,97	25,72±1,84	0,0001
PC(13:0/13:0)	4,54±0,28	1,06±0,10	<,0001
PC(19:0/19:0)	11,996,58±3,484,20	9,849,26±2,296,72	0,3779
SM(d18:1/18:1(9Z))	VARIÁVEL APENAS PARA RAÇA		

Fonte: Leite (2022)

Resultados em média ± SEM e valor de *P*. Valores de *P*<0,05, são apresentados em vermelho. Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

Tabela 10 - Efeito raça (Angus e Nelore) de lipídios analisados em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado

LIPÍDIOS Concentração (ng/mL)	ANGUS (n=80)	NELORE (n=72)	P
	Média±SEM	Média±SEM	
Ácido docosahexaenóico (DHA)	21,17±1,04	42,02±2,10	<,0001
PC(13:0/13:0)	2,85±0,31	3,14±0,29	0,5169
PC(19:0/19:0)	VARIÁVEL APENAS PARA FERTILIDADE		
SM(d18:1/18:1(9Z))	37,49±5,64	11,27±1,71	0,0002

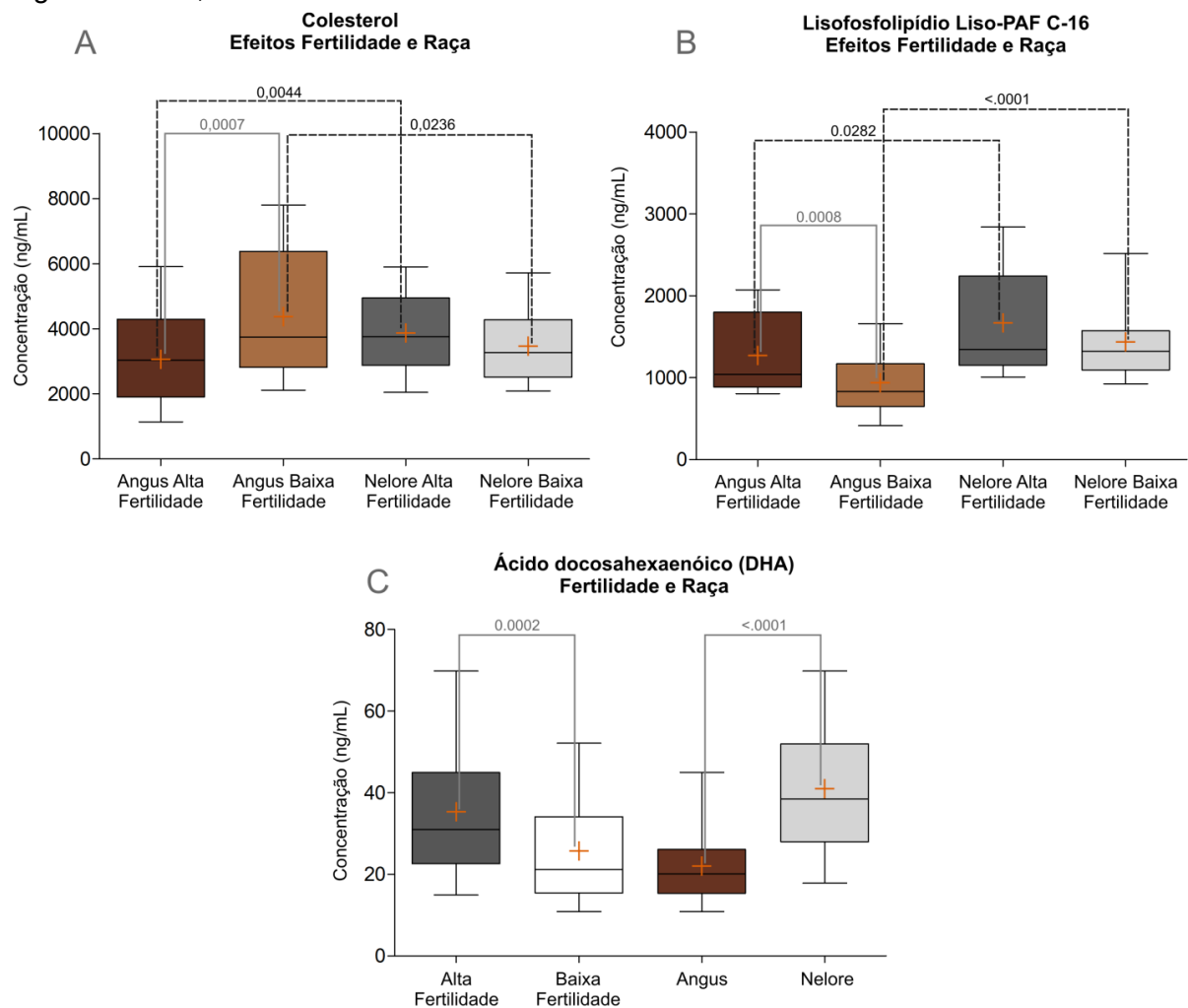
Fonte: Leite (2022)

Resultados em média ± SEM e valor de *P*. Valores de *P*<0,05, são apresentados em vermelho. Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

Os resultados para o colesterol, lipídio neutro e mais abundante na membrana plasmática de espermatozoides, mostram uma maior concentração no grupo Angus de baixa fertilidade, tanto em relação ao Nelore de baixa fertilidade (Tabela 7 e Figura 14A), quanto ao grupo Angus de alta fertilidade (Tabela 8 e Figura 14A). Entre os grupos de alta fertilidade, foi observada maior concentração de colesterol na raça Nelore, em comparação com Angus (Tabela 7 e Figura 14A). Na classe de mediadores lipídicos e ácidos graxos, os resultados mostram uma maior concentração do lisofosfolípido liso-PAF C-16, importante modulador na cadeia do ácido araquidônico, nos grupos Nelore de alta e baixa fertilidade em comparação com os respectivos grupos da raça Angus (tabela 7 e figura 14B), e no grupo Angus de alta fertilidade em relação ao Angus de baixa fertilidade (tabela 8 e figura 14B). Houve ainda uma maior concentração de ácido docosahexaenóico (DHA), importante ácido graxo de cadeia longa da membrana espermática, nos animais de

alta fertilidade em comparação com os de baixa fertilidade (tabela 9 e figura 14C), e nos touros da raça Nelore em relação à raça Angus (tabela 10 e figura 14C) .

Figura 14 - Gráficos dos resultados das análises de colesterol, liso-PAF e DHA nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade



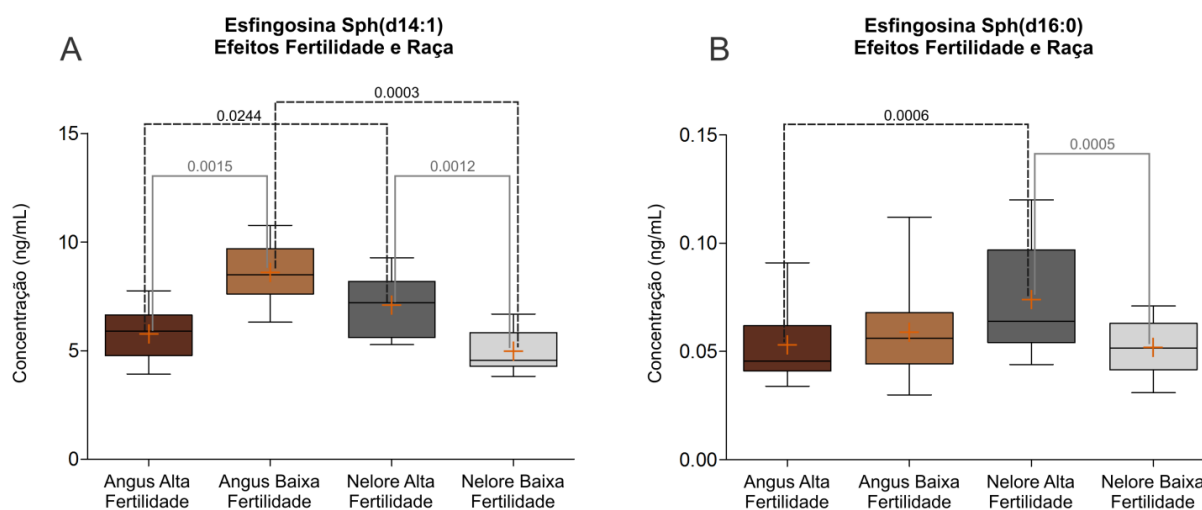
Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartil, limites mínimo e máximo (*whiskers*) e média (+ em laranja); diferenças entre os grupos são marcadas por linhas com o valor de *P* sobre as mesmas. Em A: Colesterol (interação fertilidade\*raça); Em B: Liso-PAF C-16, mediador da cadeia do ácido araquidônico (interação fertilidade\*raça); Em C: ácido docosahexaenóico (DHA) (sem interação).

Entre os lipídios analisados, foram detectadas duas esfingosinas (Sph), moléculas de sinalização de lipídios e base primária dos esfingolipídios, como as esfingomielinas. Em ambas, Sph(d14:1) (tetradecaesfingosina) e Sph(d16:0) (hexadecaesfingosina), foi observada uma maior concentração no grupo Nelore de alta fertilidade em relação aos grupos Angus de alta e Nelore de baixa fertilidade (Tabelas 7 e 8 e Figuras 15A e 15B). O grupo Angus de baixa fertilidade apresentou

maior concentração de na Sph(d14:1) em comparação com os touros Angus de alta fertilidade e Nelore de baixa fertilidade (Tabelas 7 e 8 e Figura 15A).

Figura 15 - Gráficos dos resultados das análises de esfingosinas nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

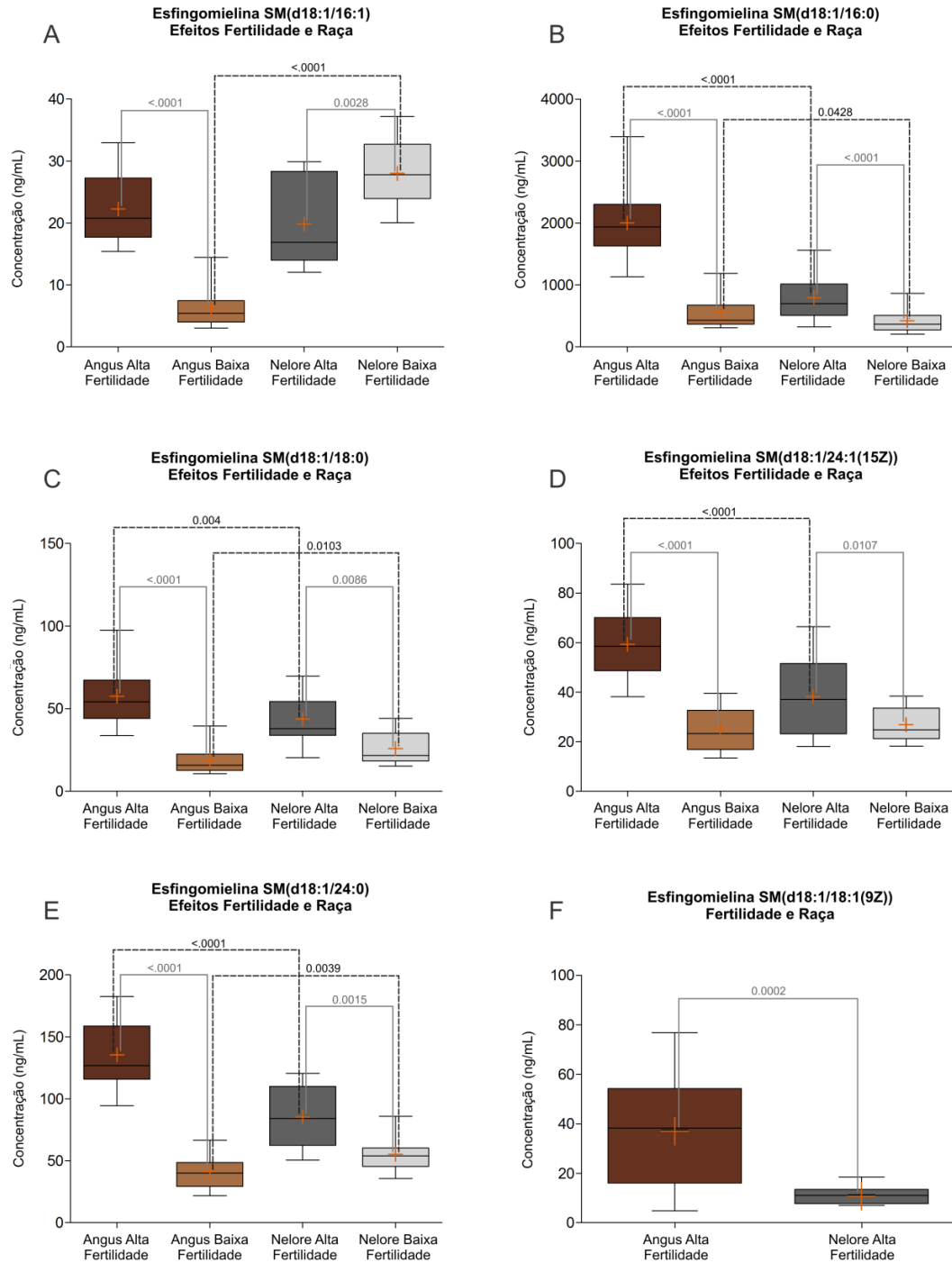
Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartil, limites mínimo e máximo (*whiskers*) e média (+ em laranja); diferenças entre os grupos são marcadas por linhas com o valor de *P* sobre as mesmas. Em A: Sph(d14:1) (interação fertilidade\*raça); Em B: Sph(d16:0) (interação fertilidade\*raça).

Seis esfingomielinas (SM) foram detectadas, classe lipídica abundante na membrana plasmática de espermatozoides e com importante papel na função espermática por sua afinidade com o colesterol, especialmente as palmitoil esfingomielinas. Houve interação em todas as esfingomielinas detectadas, com exceção da palmitoil esfingomielina SM(d18:1/18:1(9Z)), detectada apenas em animais de alta fertilidade, com a raça Angus apresentando maior concentração em relação à Nelore (Tabela 10 e Figura 16F). Excetuando a palmitoil esfingomielina SM(d18:1/16:1), entre as demais esfingomielinas detectadas - (SM(d18:1/16:0), palmitoil esfingomielina; SM(d18:1/18:0), estearoil esfingomielina; SM(d18:1/24:1(15Z)), tetracosanoil esfingomielina; e SM(d18:1/24:0), tetracosanoil esfingomielina -, os animais de alta fertilidade de ambas as raças apresentaram maior concentração em comparação com os respectivos grupos de baixa fertilidade (Tabela 8 e Figuras 16B, C, D e E). Nestas, os resultados mostraram ainda que o grupo da raça Angus de alta fertilidade possui maior concentração do que o grupo

Nelore de alta fertilidade (Tabela 7 e Figuras 16B, C, D e E). Como citado acima, a palmitoil esfingomielina SM(d18:1/16:1) foi exceção, com uma maior concentração no grupo Nelore de baixa fertilidade em comparação com o de alta fertilidade (Tabela 8 e Figura 16A). Entre os grupos de baixa fertilidade, o grupo Nelore registrou maior concentração em comparação com a raça Angus em 3 classes de esfingomielinas: (SM(d18:1/16:1), SM(d18:1/18:0) e SM(d18:1/24:0)) (Tabela 7 e Figuras 16A, C e E). Por fim, para a palmitoil esfingomielina SM(d18:1/16:0), entre os animais de baixa fertilidade, o grupo Angus apresentou maior concentração que o grupo Nelore (Tabela 7 e Figura 16B).

Quatro lisofosfatidilcolinas (LPC) foram detectadas nas amostras analisadas. Como o liso-PAF C-16, lisofosfatidilcolinas são importantes mediadores que, formadas pela hidrólise da fosfatidilcolina, podem influenciar a motilidade, capacitação e a reação acrossomal de espermatozoides. Esta classe possui diferentes combinações de ácidos graxos, de vários comprimentos e saturação, ligados ao C-1. Foi observada uma maior abundância das lisofosfatidilcolinas detectadas - LPC(17:1(10Z)/0:0), ácido heptadecenoico; LPC(16:0/0:0), ácido palmítico; LPC(18:1), ácido oleico; e LPC(18:0), ácido esteárico -, no grupo Angus de alta fertilidade tanto em relação aos Angus de baixa fertilidade, quanto em relação ao grupo Nelore de alta fertilidade (Tabelas 7 e 8 e Figuras 17A, B, C e D). O mesmo ocorreu nos grupos de baixa fertilidade, com maior concentração na raça Angus em comparação com a Nelore (Tabela 7 e Figuras 17A, B, C e D). Quanto aos grupos da raça Nelore, houve diferença apenas na LPC(17:1(10Z)/0:0), com maior concentração no grupo de alta fertilidade do que no de baixa (Tabela 8 e Figura 17A).

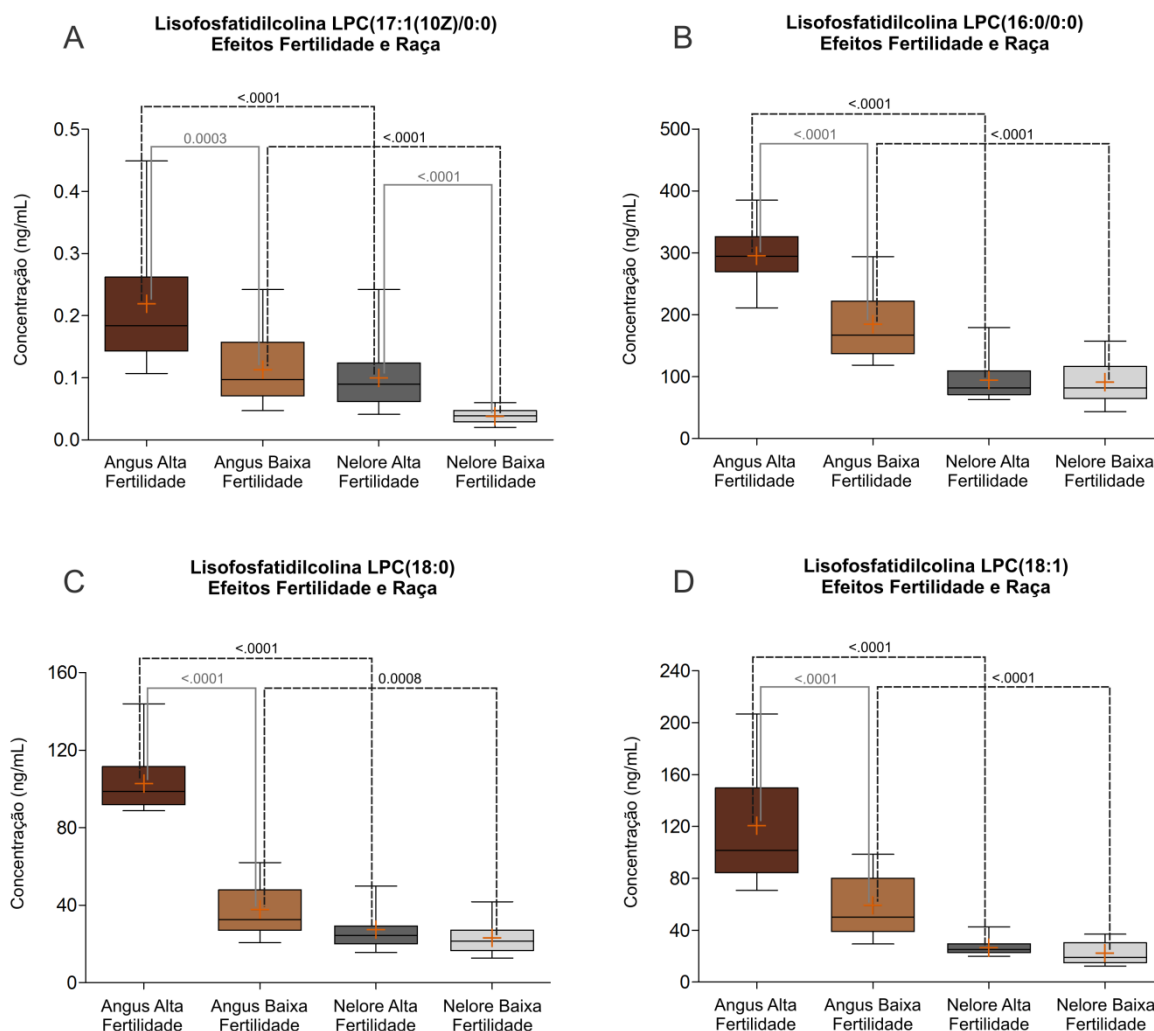
Figura 16 - Gráficos dos resultados das análises de esfingomielinas nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartil, limites mínimo e máximo (*whiskers*) e média (+ em laranja); diferenças entre os grupos são marcadas por linhas com o valor de *P* sobre as mesmas. Em A: SM(d18:1/16:1), palmitoil esfingomielina (interação fertilidade\*raça); Em B: SM(d18:1/16:0), palmitoil esfingomielina (interação fertilidade\*raça); Em C: SM(d18:1/18:0), estearoil esfingomielina (interação fertilidade\*raça); Em D: SM(d18:1/24:1(15Z)), tetracosanoil esfingomielina (interação fertilidade\*raça); Em E: SM(d18:1/24:0) tetracosanoil esfingomielina (interação fertilidade\*raça); Em F: SM(d18:1/18:1(9Z)) palmitoil esfingomielina (efeito raça, detectada apenas em amostras de alta fertilidade).

Figura 17 - Gráficos dos resultados das análises de lisofosfatidilcolinas nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

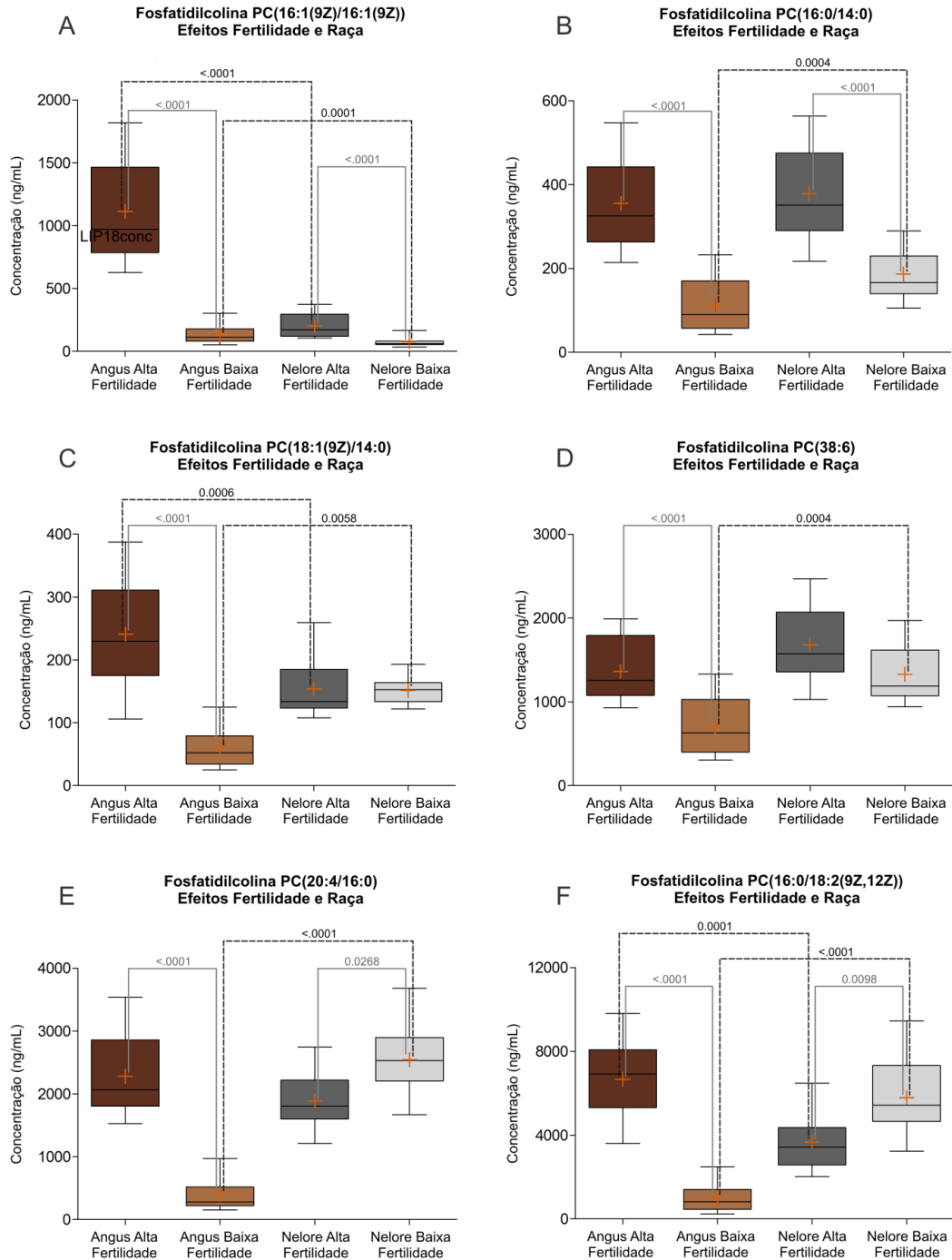
Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartis, limites mínimo e máximo (*whiskers*) e média (+ em laranja); diferenças entre os grupos são marcadas por linhas com o valor de *P* sobre as mesmas. Em A: LPC(17:1(10Z)/0:0), ligação com ácido heptadecenóico (interação fertilidade\*raça); Em B: LPC(16:0/0:0), ligação com ácido palmítico (interação fertilidade\*raça); Em C: LPC(18:0), ligação com ácido esteárico (interação fertilidade\*raça); Em D: LPC(18:1), ligação com ácido oleico (interação fertilidade\*raça).

Entre os fosfolípidios, as fosfatidilcolinas (PC) estão entre os componentes mais abundantes e importantes da bicamada lipídica da membrana de espermatozoides, apresentando diferentes combinações de ácidos graxos, de vários comprimentos e saturação, ligados nas posições C-1 e C-2. Nesta classe, houve interação em 12 das fosfatidilcolinas detectadas: PC(16:1(9Z)/16:1(9Z)), duas cadeias de ácido palmitoléico; PC(16:0/14:0), ligação com ácidos palmítico e mirístico; PC(18:1(9Z)/14:0), ácidos oleico e mirístico; PC(38:6), ácidos palmítico e

docosaheptaenóico; PC(20:4/16:0), ácidos araquidônico e palmítico; PC(16:0/18:2(9Z,12Z)), ácidos palmítico e ácido linoléico; PC(18:0/14:0), ácidos esteárico e mirístico; PC(18:0/22:6), ácidos esteárico e docosaheptaenóico; PC(18:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)), ácidos esteárico e araquidônico; PC(18:0/18:2(9Z,12Z)), ácidos esteárico e linoléico; PC(17:0/17:0), duas cadeias de ácido heptadecanóico; e PC(18:1(9Z)/18:0), ácidos oleico e esteárico (Tabela 6). O grupo Angus de alta fertilidade apresentou maior concentração de todas em relação ao Angus de baixa fertilidade (Tabela 8 e Figuras 18A a 18F e 19A a 19F) e, de nove delas em relação ao grupo Nelore de alta fertilidade ((PC(16:1(9Z)/16:1(9Z)), PC(18:1(9Z)/14:0), PC(16:0/18:2(9Z,12Z)), PC(18:0/14:0), PC(18:0/22:6), PC(18:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)), PC(18:0/18:2(9Z,12Z)), PC(17:0/17:0) e PC(18:1(9Z)/18:0)) (Tabela 7 e Figuras 18A, C e F e 19A a F). Entre as amostras de animais da raça Nelore, houve diferença em 5 fosfatidilcolinas. O grupo de alta fertilidade apresentou maior concentração em três delas ((PC(16:1(9Z)/16:1(9Z)), PC(16:0/14:0) e PC(17:0/17:0)) e menor concentração em duas ((PC(20:4/16:0) e PC(16:0/18:2(9Z,12Z))) em comparação com o grupo Nelore de baixa fertilidade (Tabela 8 e Figuras 18A, B, E e F e 19E). Por fim, entre os grupos de baixa fertilidade, foi observada maior concentração de oito fosfatidilcolinas ((PC(16:0/14:0), PC(18:1(9Z)/14:0), PC(38:6), PC(20:4/16:0), PC(16:0/18:2(9Z,12Z)), PC(18:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)), PC(18:0/18:2(9Z,12Z)) e PC(18:1(9Z)/18:0)) nos animais da raça Nelore em comparação com os da raça Angus (Tabela 7 e Figuras 18B, C, D, E e F e 19C, D e F). Este último (Ab) apresentou maior concentração que o grupo Nb apenas na PC(16:1(9Z)/16:1(9Z)) (Tabela 7 e Figura 18A). Entre as duas fosfatidilcolinas sem interação, só houve diferença em uma, a PC(13:0/13:0), que possui ligação com duas cadeias de ácido tridecanóico, na qual houve maior concentração nos animais de alta fertilidade em relação aos de baixa fertilidade (tabela 9 e Figura 20).



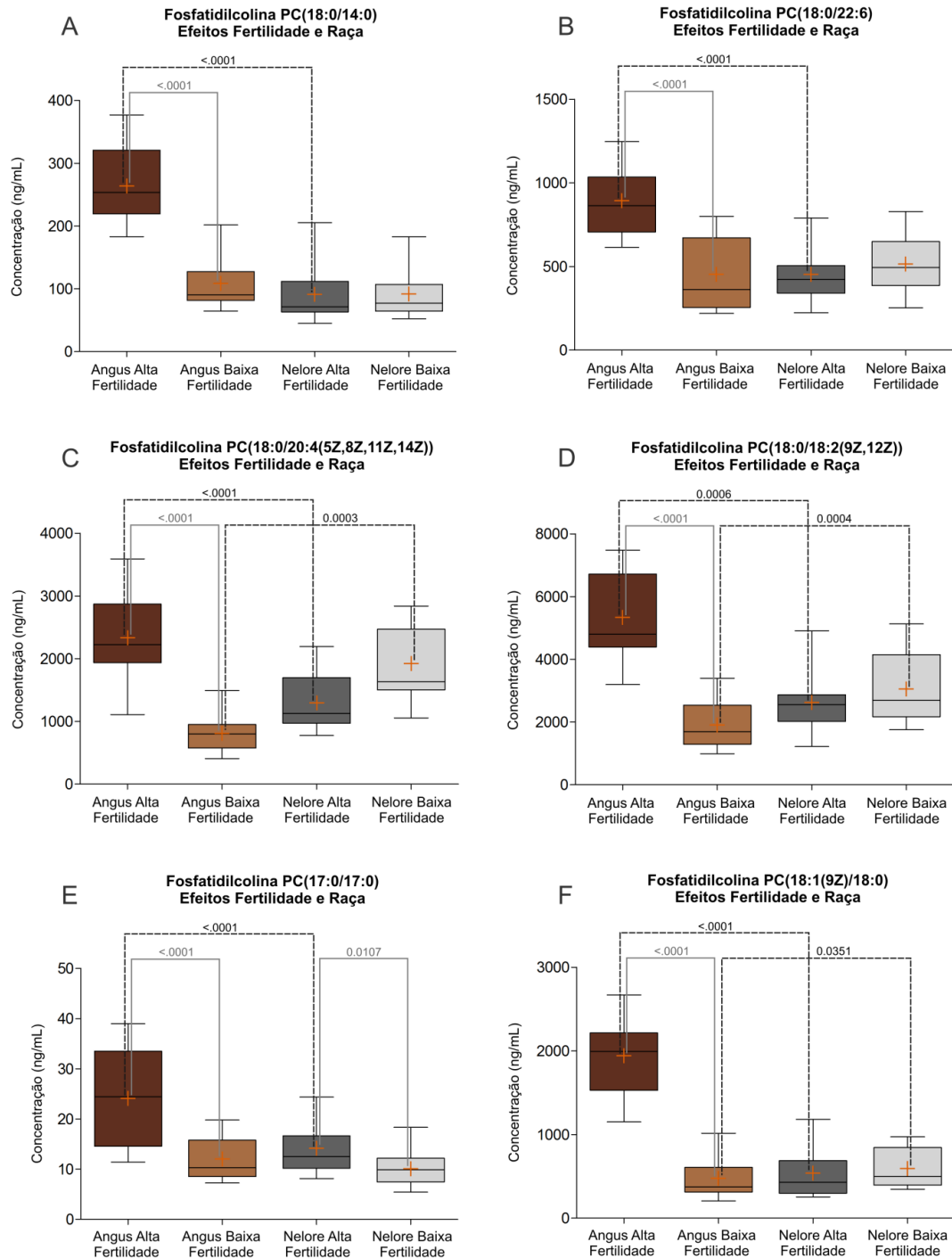
Figura 18 - Gráficos dos resultados das análises de fosfatidilcolinas nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartil, limites mínimo e máximo (*whiskers*) e média (+ em laranja); diferenças entre os grupos são marcadas por linhas com o valor de *P* sobre as mesmas. Em A: PC(16:1(9Z)/16:1(9Z)), ligação com duas cadeias de ácido palmitoléico (interação fertilidade\*raça); Em B: PC(16:0/14:0), ligação com ácidos palmítico e mirístico (interação fertilidade\*raça); Em C: PC(18:1(9Z)/14:0), ácidos oleico e mirístico (interação fertilidade\*raça); Em D: PC(38:6), ácidos palmítico e docosahexaenóico (interação fertilidade\*raça); Em E: PC(20:4/16:0), ácidos araquidônico e palmítico (interação fertilidade\*raça); em F: PC(16:0/18:2(9Z,12Z)), ácidos palmítico e ácido linoléico (interação fertilidade\*raça).

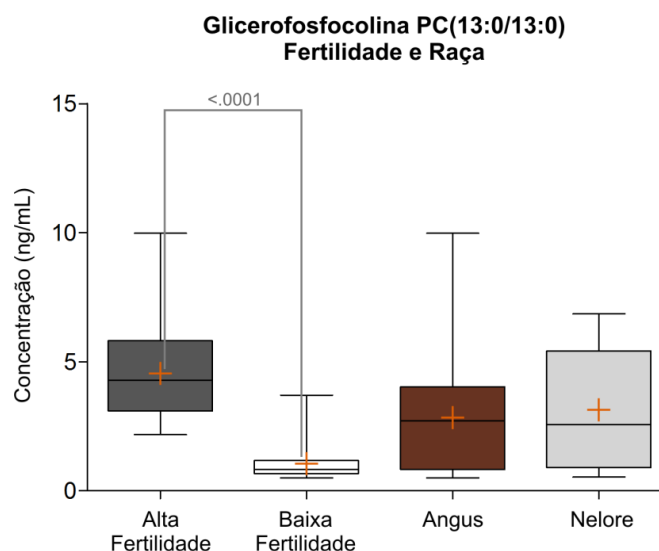
Figura 19 - Gráficos dos resultados das análises de fosfatidilcolinas nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartis, limites mínimo e máximo (*whiskers*) e média (+ em laranja); diferenças entre os grupos são marcadas por linhas com o valor de *P* sobre as mesmas. Em A: PC(18:0/14:0), ácidos esteárico e mirístico (interação fertilidade\*raça); Em B: PC(18:0/22:6), ácidos esteárico e docosahexaenóico (interação fertilidade\*raça); Em C: PC(18:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)), ácidos esteárico e araquidônico (interação fertilidade\*raça); Em D: PC(18:0/18:2(9Z,12Z)), ácidos esteárico e linoléico (interação fertilidade\*raça); Em E: PC(17:0/17:0), duas cadeias de ácido heptadecanóico (interação fertilidade\*raça); em F: PC(18:1(9Z)/18:0), ácidos oleico e esteárico (interação fertilidade\*raça).

Figura 20 - Gráfico dos resultados das análises de fosfatidilcolinas nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

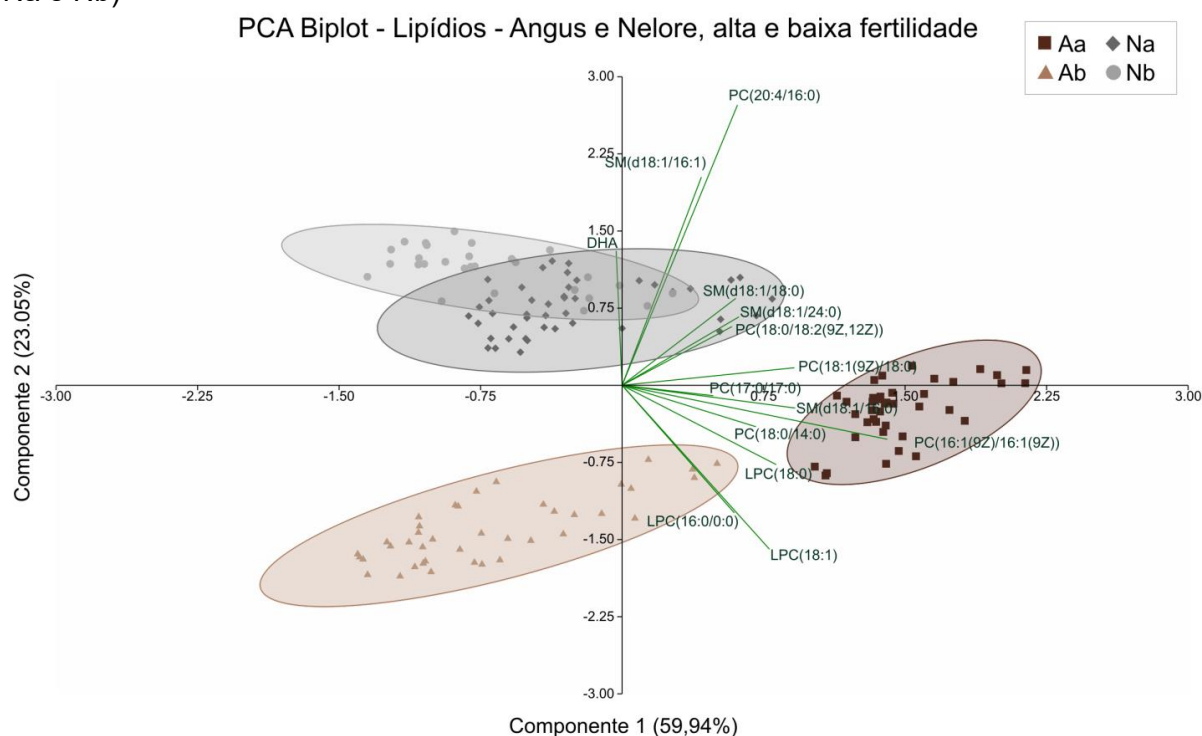
Fosfatidilcolina PC(13:0/13:0), que possui ligação com duas cadeias de ácido tridecanóico. Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartil, limites mínimo e máximo (*whiskers*) e média (+ em laranja); diferenças entre os grupos são marcadas por linhas com o valor de *P* sobre as mesmas.

#### 3.4.2.1.2 Resultados de PCA e PLS-DA

Nas análises multivariadas de PCA e PLS-DA contendo os quatro grupos estudados (Aa, Ab, Na e Nb) os dados foram normalizados com transformação por log e escala automática (centralizada pela média e dividida pelo desvio padrão de cada variável). Após análises iniciais dos resultados de correlação e prévios de PCA (*loadings*) e PLS-DA (*VIP score*), 14 lipídios foram selecionados para o modelo e submetidos novamente a PCA, enquanto 16 lipídios foram selecionados para PLS-DA. Nos resultados de PCA, o componente principal 1 foi responsável por 59,9% da variância e o componente principal 2, por 23,1%, com a soma correspondendo a 83% da variância (Figura 21). Observou-se separação entre os clusters de amostras e elipses de IC nos grupos Angus de alta e baixa fertilidades e entre as raças Angus e Nelore, mas o mesmo não ocorreu entre os grupos da raça Nelore (Na e Nb). A apresentação em *biplot* do gráfico de PCA inclui a influência dos lipídios sobre a variância dos grupos analisados, no qual se observa que PC(20:4/16:0), SM(d18:1/16:1) e DHA tem maior influência sobre a raça Nelore e sua separação da raça Angus, enquanto lipídios das classes LPC, PC e SM têm maior influência na raça Angus e sua separação entre os grupos de alta e baixa fertilidade. Na análise de PLS-DA, método de classificação supervisionado que considera dados

conhecidos dos grupos no momento de separação das amostras, promovendo assim uma maior separação entre os grupos, se obteve resultado semelhante entre os grupos Aa e Ab e entre as raças (Figura 22A), com os componentes 1 e 2 respondendo por 76,3% da variância. A validação do modelo gerado pelos dois componentes do PLS-DA aponta acurácia de 86%, que o mesmo foi bem construído ( $R^2=0,899$ ) e possui boa predição ( $Q^2=0,894$ ). Os lipídios que mais contribuíram para a separação são apresentados no gráfico de VIP score, com cinco lipídios com score acima de 1: PC(16:1(9Z)/16:1(9Z)), SM(d18:1/16:0), PC(18:1(9Z)/18:0), LPC(16:0/0:0) e LPC(18:1) (Figura 22B). Portanto, os resultados de análises multivariadas realizadas indicaram diferenças nas classes lipídicas entre os grupos Aa e Ab e entre as raças Angus e Nelore. Considerando-se os resultados da comparação conjunta entre os quatro grupos analisados, foram realizadas ainda análises de PCA e PLS-DA com as raças separadas.

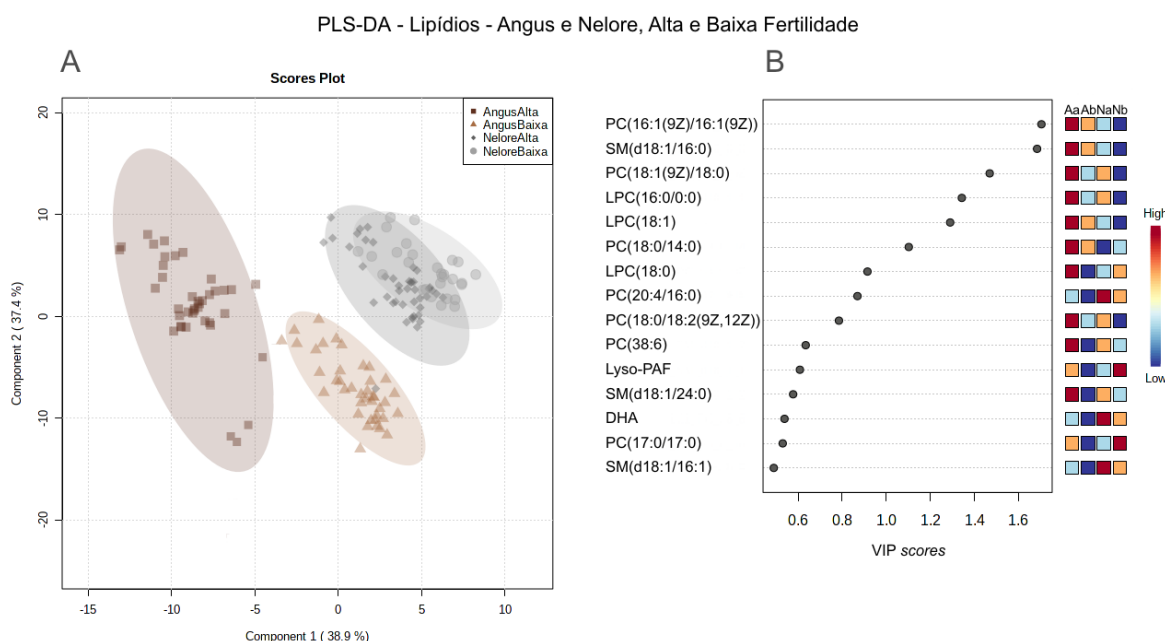
Figura 21 - PCA em apresentação *biplot* de lipídios nos quatro grupos estudados (Aa, Ab, Na e Nb)



Fonte: Leite (2022)

Representação gráfica da separação entre os grupos Aa, Ab, Na e Nb com os componentes principais 1 e 2, que respondem por uma variância total de 82,98%. A variância explicada pelos componentes é apresentada entre parênteses. Os *clusters* das amostras dos grupos são indicados conforme a legenda e circundados por elipses de IC. As linhas e texto em verde indicam as variáveis selecionadas e a importância das mesmas (escala *eigenvalue*) na variância e separação dos grupos.

Figura 22 - PLS-DA e VIP scores de lipídios nos quatro grupos estudados (Aa, Ab, Na e Nb)

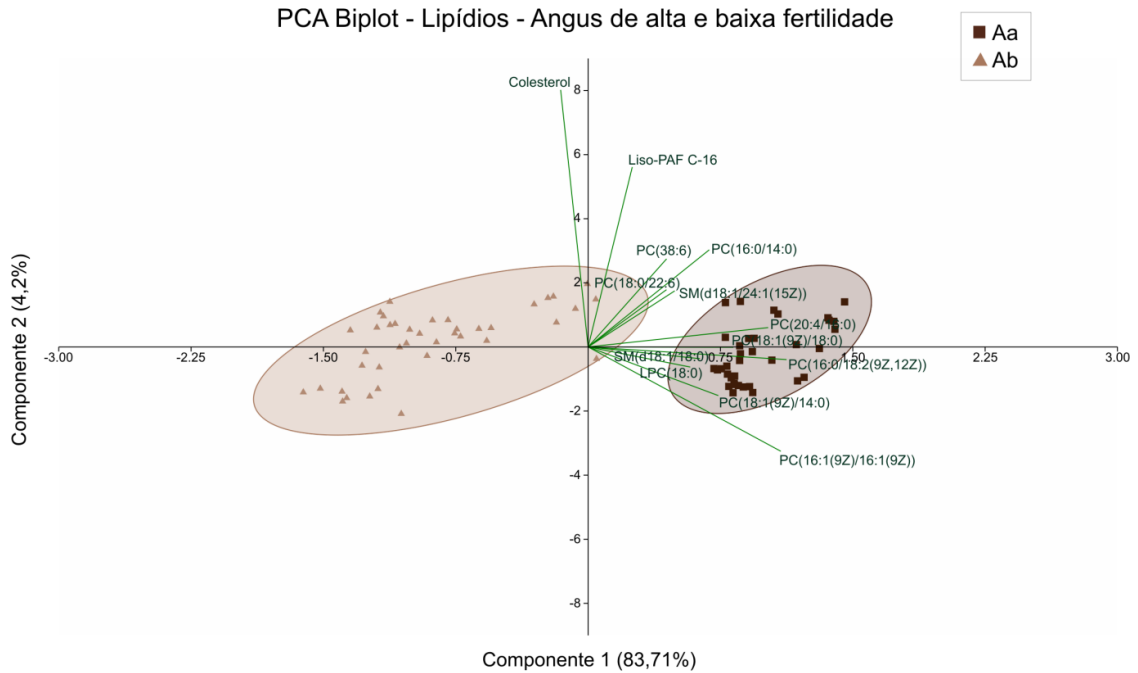


Fonte: Leite (2022)

Em A: *score plot* dos componentes selecionados (1 e 2), que respondem por 76,3% da variância; Em B: *VIP score* do componente 1; o *score* dos metabólitos listados à esquerda está relacionado com a sua contribuição na variância explicada pelo componente; os quadrados em cores apresentados à direita indicam as concentrações relativas dos metabólito em cada grupo analisado.

As análises de PCA e PLS-DA entre os grupos Angus de alta e baixa fertilidade foram realizadas após normalização dos dados (transformação por log e escala centralizada pela média), com a seleção de 13 lipídios para o modelo de PCA e 16 lipídios para PLS-DA, considerando resultados de análises iniciais de *fold change*, correlação e *loadings*. Na PCA, o componente principal 1 foi responsável por 83,7% da variância e o componente principal 2, por 4,2%, totalizando 87,9% (Figura 23). O componente 1 respondeu por quase a totalidade da variância e separação dos grupos, resultado esperado considerando-se as diferenças observadas e apresentadas no item 3.4.2.1.1 entre os grupos Aa e Ab nas classes lipídicas detectadas. O mesmo resultado foi observado na análise de PLS-DA (validação do modelo com acurácia de 100%,  $R^2=0,929$  e  $Q^2=0,911$ ), na qual os dois primeiros componentes respondem por 84,6% da variância (Figura 24A). Os lipídios que mais contribuíram para a separação entre os grupos foram da classe de fosfatidilcolinas, especialmente as PC(16:0/18:2(9Z,12Z)), PC(16:1(9Z)/16:1(9Z)) e PC(18:1(9Z)/14:0), com o colesterol tendo maior influência sobre o grupo Ab, como pode ser observado no gráfico PCA *biplot* (Figura 23). As fosfatidilcolinas também estão presentes entre os maiores *VIP scores*, junto com as esfingomielinas SM(d18:1/24:0) e SM(d18:1/16:0) (Figura 24B).

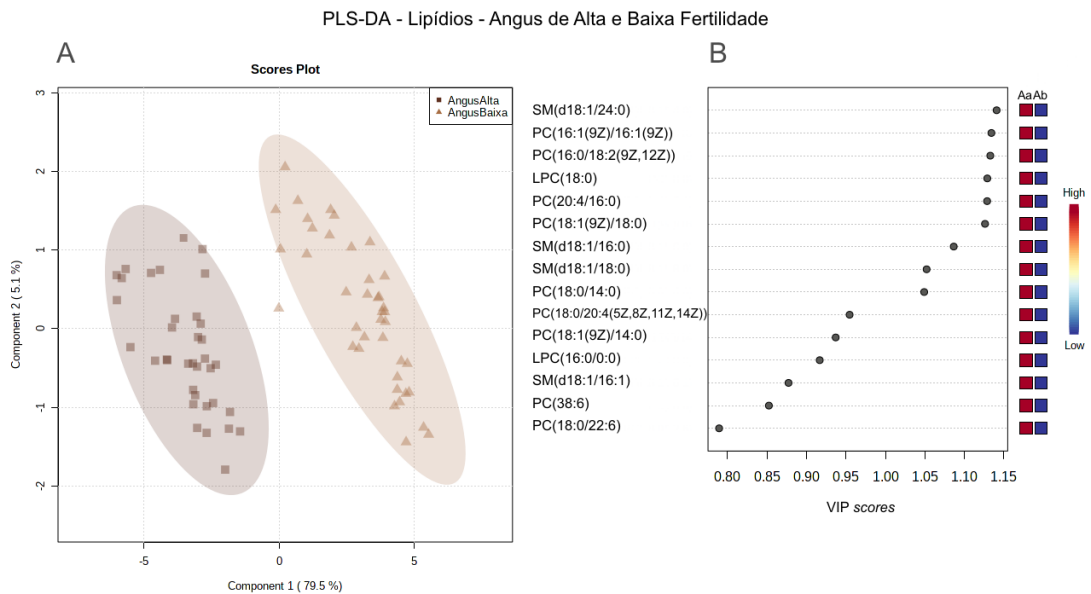
Figura 23 - PCA em apresentação *biplot* de lipídios nos grupos Angus de alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

Representação gráfica da separação entre os grupos Aa e Ab com os componentes principais 1 e 2, que respondem por uma variância total de 87,91%. A variância explicada pelos componentes é apresentada entre parênteses. Os *clusters* das amostras dos grupos são indicados conforme a legenda e circundados por elipses de intervalo de IC. As linhas e texto em verde indicam as variáveis selecionadas e a importância das mesmas (escala *eigenvalue*) na variância e separação dos grupos.

Figura 24 - PLS-DA e VIP scores de lipídios nos grupos Angus de alta e baixa fertilidade.

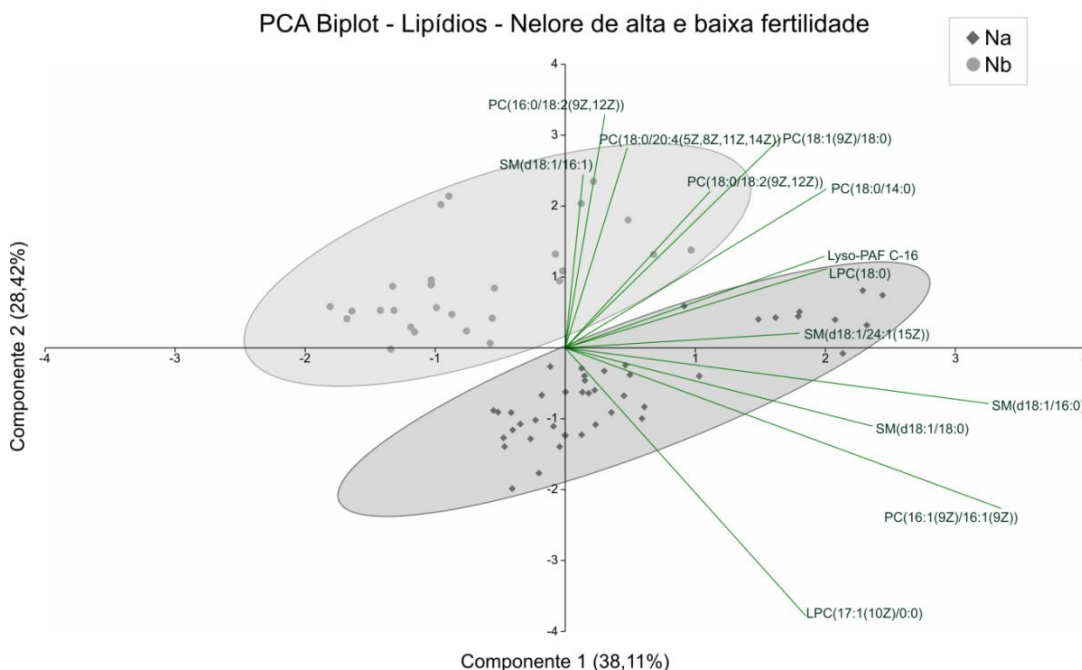


Fonte: Leite (2022)

Em A: *score plot* dos componentes selecionados (1 e 2), que respondem por 84,6% da variância; Em B: VIP score do componente 1; o score dos metabólitos listados à esquerda está relacionado com a sua contribuição na variância explicada pelo componente; os quadrados em cores apresentados à direita indicam as concentrações relativas dos metabólito em cada grupo analisado.

Os dados dos grupos Nelore de alta e baixa fertilidade foram normalizados com transformação por log e centralização pela média antes de submetidos às análises multivariadas. Treze lipídios foram selecionados considerando-se os resultados de *fold change*, correlação e *loadings* para o modelo de PCA e 15 para PLS-DA. Na PCA, os componentes principais 1 e 2 responderam, respectivamente, por 38,1% e 28,4% da variância, com valor total de 66,5% (Figura 25). A análise isolada dos grupos da raça Nelore permitiu uma separação dos *clusters* de amostras e elipses de IC. Resultado semelhante foi observado na análise supervisionada de PLS-DA (validação do modelo com acurácia de 97%,  $R^2=0,807$  e  $Q^2=0,778$ ), no entanto, os dois primeiros componentes respondem por menos que 50% e há uma pequena sobreposição das elipses de IC (Figura 26A). Estes resultados demonstram que os lipídios analisados possuem um efeito menor sobre os componentes para a predição de separação dos grupos na raça Nelore, em comparação com os resultados dos grupos Angus, como observado nas análises realizadas entre os quatro grupos.

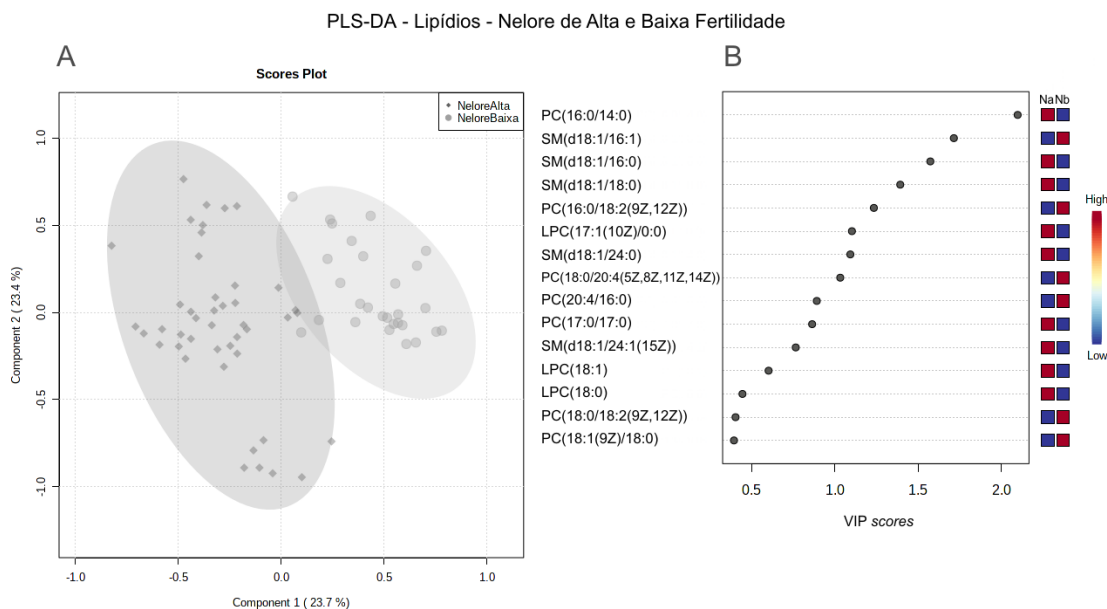
Figura 25 - PCA em apresentação *biplot* de lipídios nos grupos Nelore de alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

Representação gráfica da separação entre os grupos Na e Nb com os componentes principais 1 e 2, que respondem por uma variância total de 66,54%. A variância explicada pelos componentes é apresentada entre parênteses. Os *clusters* das amostras dos grupos são indicados conforme a legenda e circundados por elipses de IC. As linhas e texto em verde indicam as variáveis selecionadas e a importância das mesmas (escala *eigenvalue*) na variância e separação dos grupos.

Figura 26 - PLS-DA de lipídios nos grupos Nelore de alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

Em A: *score plot* dos componentes selecionados (1 e 2) que respondem por 47,1% da variância; Em B: *VIP score* do componente 1; o *score* dos metabólitos listados à esquerda está relacionado com a sua contribuição na variância explicada pelo componente; os quadrados em cores apresentados à direita indicam as concentrações relativas dos metabólito em cada grupo analisado.

### 3.4.2.2 Carnitinas

Carnitinas são metabólitos carreadores de ácidos graxos e possuem um importante papel no metabolismo energético das células espermáticas, transportando ácidos graxos de cadeia longa para as mitocôndrias para a sua oxidação e produção de energia. Os resultados dessa classe de metabólitos, abrangem as diferenças entre os grupos estudados (Aa, Ab, Na e Nb) obtidas pela análise fatorial, de variáveis com e sem interação, e as análises multivariadas de PCA e PLSA, os quais são apresentados abaixo em dois tópicos distintos.

#### 3.4.2.2.1 Resultados de interação e diferenças entre os grupos

Entre as 11 carnitinas analisadas, foi possível observar interação fertilidade\*raça em nove delas (Tabela 11). Foram observadas diferenças importantes entre os grupos, tanto no efeito da raça sobre a fertilidade (Tabela 12) quanto da fertilidade sobre a raça (Tabela 13). Os resultados de carnitinas que não apresentaram interação foram divididos em efeito fertilidade (Tabela 14) e efeito raça (Tabela 15).



Tabela 11 - Resultados da análise de interação de fertilidade (Alta vs Baixa) e raça (Angus vs Nelore) de carnitinas analisadas em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado

CARNITINAS	Valores de <i>P</i>		
	RAÇA	FERTILIDADE	RAÇA*FERTILIDADE
Propionil-L-carnitina	0,0191	0,0596	<,0001
Butiril-L-carnitina	0,0007	0,1258	0,004
Hexanoil-L-carnitina	0,1378	0,0594	0,2413
Octanoil-L-carnitina	0,084	<,0001	0,0007
O-Decanoil-L carnitina	0,9651	0,0081	0,5715
Lauroil-L-carnitina	0,0432	0,2023	0,0852
Tetradecanoilcarnitina	<,0001	0,4623	0,0364
Palmitoil-L-carnitina	<,0001	<,0001	0,0142
Estearoil-L-carnitina	0,0395	<,0001	<,0001
Acetilcarnitina	<,0001	<,0001	0,0031
L-carnitina	0,0026	<,0001	0,0191

Fonte: Leite (2022)

Valores de  $P < 0,1$  foram considerados como interação entre os fatores e são apresentados em vermelho.

Tabela 12 - Efeito do grupo genético (Angus e Nelore) sobre a fertilidade (alta e baixa) de carnitinas analisadas em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado

CARNITINAS Concentração (ng/mL)	ALTA FERTILIDADE		<i>P</i>	BAIXA FERTILIDADE		<i>P</i>
	ANGUS ( <i>n</i> =40)	NELORE ( <i>n</i> =44)		ANGUS ( <i>n</i> =40)	NELORE ( <i>n</i> =28)	
	Média±SEM	Média±SEM		Média±SEM	Média±SEM	
Propionil-L-carnitina	9,98±1,33	17,57±1,23	<,0001	18,00±1,50	13,32±1,09	0,0757
Butiril-L-carnitina	12,32± 1,38	11,03±1,15	0,7188	17,31± 1,72	8,88±0,62	<,0001
Octanoil-L-carnitina	1,22± 0,15	1,77±0,13	0,0003	1,04±0,09	0,97±0,13	0,2877
Lauroil-L-carnitina	5,15± 0,39	4,07±0,39	0,0118	3,92±0,29	3,74±0,31	0,8111
Tetradecanoilcarnitina	6,19±0,46	3,86±0,45	<,0001	4,64±0,37	3,71±0,38	0,0625
Palmitoil-L-carnitina	19,00±2,06	25,39±1,69	0,0013	7,21±0,69	17,10±1,93	<,0001
Estearoil-L-carnitina	44,34±2,43	36,40±3,19	0,0037	11,52± 0,97	23,93±1,43	<,0001
Acetilcarnitina	906,42±43,88	1,378,78±54,54	<,0001	1,590,19±90,25	1,75,31±100,83	0,1782
L-carnitina	1,882,62±65,42	1,931,66±63,82	0,5924	1,325,52±61,18	1,655,44±72,30	0,0008

Fonte: Leite (2022)

Resultados em média ± SEM e valor de *P*. Valores de  $P < 0,05$ , são apresentados em vermelho. Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

Tabela 13 - Efeito da fertilidade (alta e baixa) sobre os grupos genéticos (Angus e Nelore) de carnitinas analisadas em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado

CARNITINAS Concentração (ng/mL)	ANGUS		P	NELORE		P
	ALTA FERTILIDADE (n=40)	BAIXA FERTILIDADE (n=40)		ALTA FERTILIDADE (n=44)	BAIXA FERTILIDADE (n=28)	
	Média±SEM	Média±SEM		Média±SEM	Média±SEM	
Propionil-L-carnitina	9,98±1,33	18,00±1,50	<,0001	17,57±1,23	13,32±1,09	0,0101
Butiril-L-carnitina	12,32±1,38	17,31±1,72	0,0034	11,03±1,15	8,88±0,62	0,2941
Octanoil-L-carnitina	1,22±0,15	1,04±0,09	0,5956	1,77±0,13	0,97±0,13	<,0001
Lauroil-L-carnitina	5,15±0,39	3,92±0,29	0,0167	4,07±0,39	3,74±0,31	0,7576
Tetradecanoilcarnitina	6,19±0,46	4,64±0,37	0,0168	3,86±0,45	3,71±0,38	0,3623
Palmitoil-L-carnitina	19,00±2,06	7,21±0,69	<,0001	25,39±1,69	17,10±1,93	0,0002
Estearoil-L-carnitina	44,34±2,43	11,52±0,97	<,0001	36,40±3,19	23,93±1,43	0,0166
Acetilcarnitina	906,42±43,88	1,590,19±90,25	<,0001	1,378,78±54,54	1,750,31±100,83	0,0012
L-carnitina	1,882,62±65,42	1,325,52±61,18	<,0001	1,931,66±63,82	1,655,44±72,30	0,0058

Fonte: Leite (2022)

Resultados em média ± SEM e valor de P. Valores de P<0,05, são apresentados em vermelho. Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

Tabela 14 - Efeito fertilidade (alta e baixa) em carnitinas analisadas em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado

CARNITINAS Concentração (ng/mL)	ALTA FERTILIDADE (n=84)	BAIXA FERTILIDADE (n=68)	P
	Média±SEM	Média±SEM	
Hexanoil-L-carnitina	2,91±0,20	2,33±0,16	0,0594
O-Decanoil-L-carnitina	2,44±0,18	1,85±0,15	0,0081

Fonte: Leite (2022)

Resultados em média ± SEM e valor de P. Valores de P<0,05, são apresentados em vermelho. Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

Tabela 15 - Efeito raça (Angus e Nelore) em carnitinas analisadas em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado

CARNITINAS Concentração (ng/mL)	ANGUS (n=80)	NELORE (n=72)	P
	Média±SEM	Média±SEM	
Hexanoil-L-carnitina	2,51±0,19	2,82±0,19	0,1378
O-Decanoil-L-carnitina	2,13±0,16	2,23±0,18	0,9651

Fonte: Leite (2022)

Resultados em média ± SEM e valor de P.

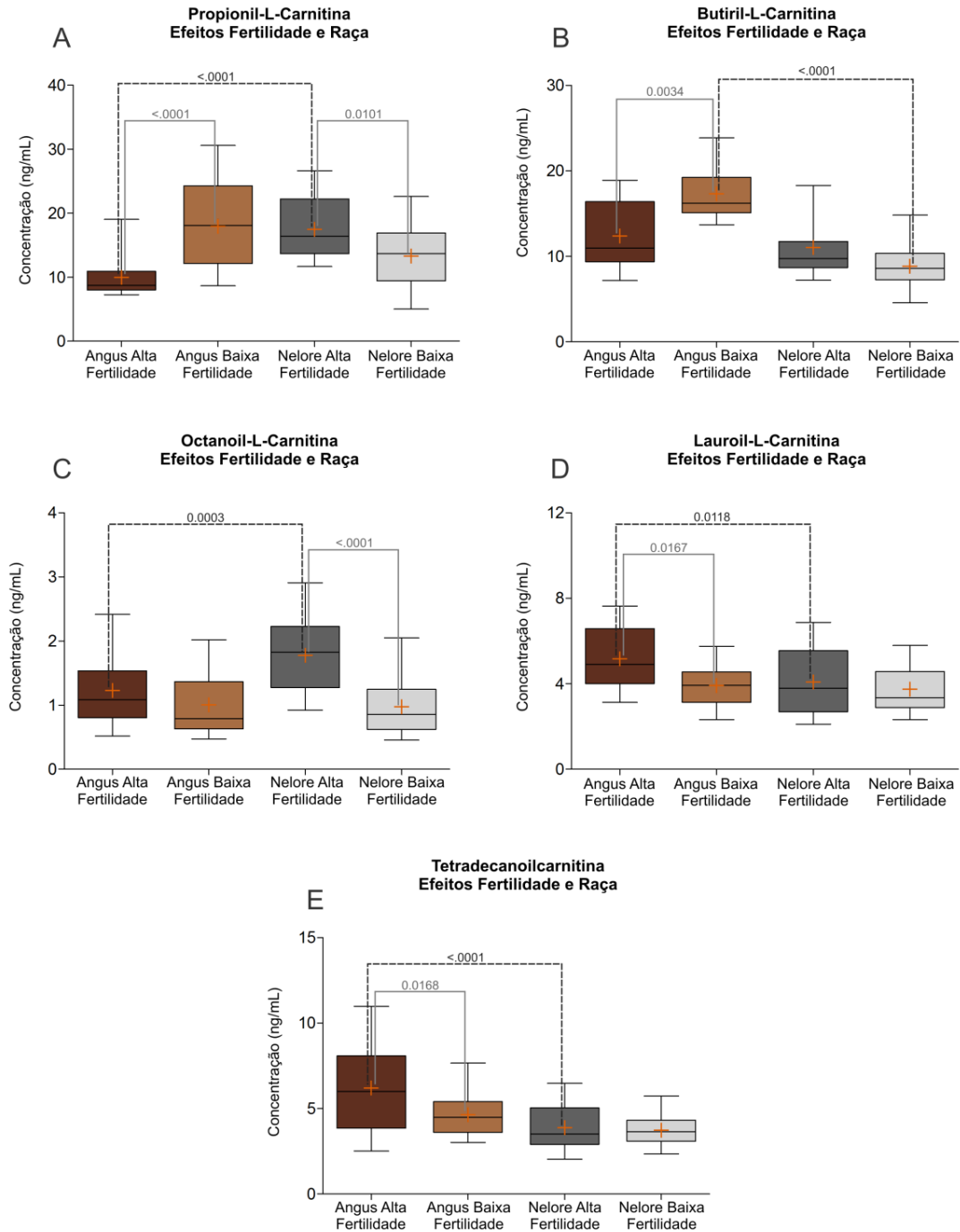
O grupo Angus de alta fertilidade apresentou maior concentração de lauroil-L-carnitina, tetradecanoilcarnitina e estearoil-L-carnitina, ésteres de L-carnitina, que o Nelore de alta fertilidade, (Tabela 12 e Figuras 27D, E e 28B) e o Angus de baixa

fertilidade (Tabela 13 e Figuras 27D, E e 28B). Estas três carnitinas atuam como intermediárias no metabolismo energético, com a produção de energia pelo transporte de ácidos graxos de cadeia longa para as mitocôndrias. Em relação à última (estearoil), ela está em maior concentração nos animais de alta fertilidade, considerando-se também a comparação na raça Nelore (Tabela 13 e Figura 28B). O mesmo é observado na palmitoil-L-carnitina, que além de atuar no transporte de ácidos graxos, está envolvida na alteração da fluidez de membrana e alteração na atividade de determinadas proteínas, com os animais de alta fertilidade das duas raças com maior concentração que os de baixa fertilidade (Tabela 13 e Figura 28A). Além disso, os animais da raça Nelore apresentam maior concentração de palmitoil-L-carnitina que os respectivos grupos da raça Angus (Tabela 12 e Figura 28A). Os Angus e Nelore de alta fertilidade possuem ainda maior concentração de L-carnitina em comparação com os animais de baixa fertilidade (Tabela 13 e Figura 28D), a qual possui papel antioxidante e atua como cofator no transporte de ácidos graxos. O grupo Nelore de alta fertilidade possui maior concentração de propionil-L-carnitina e octanoil-L-carnitina em comparação com os grupos Aa e Nb (Tabelas 12 e 13 e Figuras 27A e C). Entre estas, é importante destacar que a propionil-L-carnitina pode ser quebrada em L-carnitina e propionil-CoA, produto intermediário do ciclo do ácido cítrico (CAC). Dentre os grupos de alta fertilidade, o grupo Na apresenta ainda maior concentração de acetilcarnitina que o grupo Aa (Tabela 12 e Figura 28C).

A acetilcarnitina possui ação no controle da concentração de acetil-CoA, facilita o transporte desta molécula para a matriz mitocondrial e tem papel em mecanismos antioxidantes. A mesma foi detectada em maior concentração nos grupos de baixa fertilidade (Ab e Nb) em comparação com os respectivos grupos de alta fertilidade (Aa e Na) (Tabela 13 e Figura 28C). Entre os animais de baixa fertilidade, os Angus apresentaram ainda maior concentração de butiril-L-carnitina em comparação com o grupo de alta fertilidade (Tabela 13 Figura 27B), bem como em relação ao Nelore de baixa fertilidade (Tabela 12 e Figura 27B). Além de maior concentração de acetilcarnitina e butiril-L-carnitina, o grupo Angus de baixa fertilidade também possui maior concentração de propionil-L-carnitina do que o grupo Angus de alta fertilidade. No entanto, quanto à estearoil-L-carnitina, e L-carnitina, o grupo Angus de baixa fertilidade possui menor concentração em comparação com o Nelore de baixa fertilidade (Tabela 12 e Figuras 28B e 28D). Por

fim, entre as carnitinas que não apresentaram interação, foi detectada uma maior concentração de O-decanoil-L-carnitina em animais de alta fertilidade em comparação com os de baixa (Tabela 14 e Figura 28E).

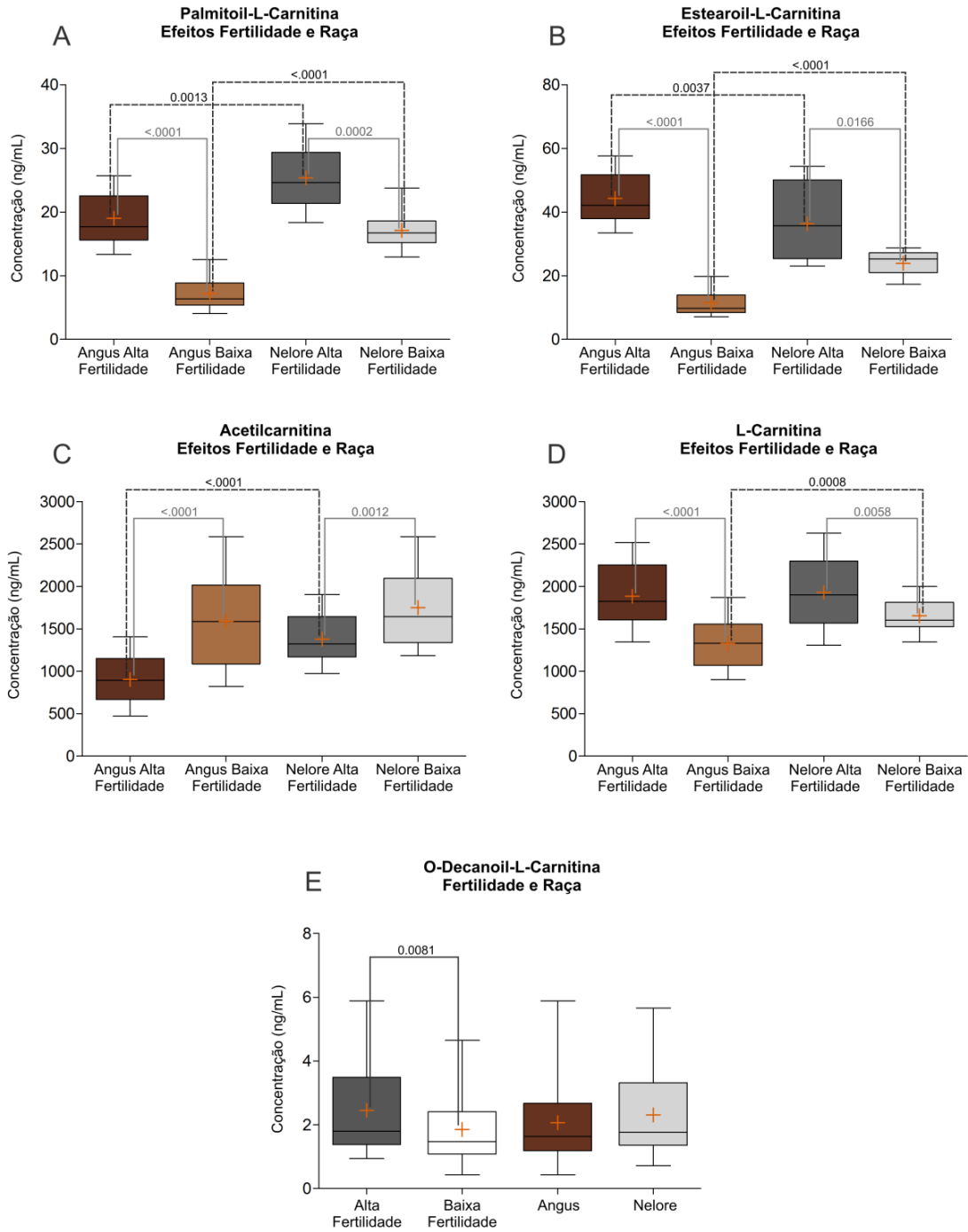
Figura 27 - Gráficos dos resultados das análises de carnitinas nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartis, limites mínimo e máximo (*whiskers*) e média (+ em laranja); diferenças entre os grupos são marcadas por linhas com o valor de *P* sobre as mesmas. Em A: Propionil-L-carnitina; Em B: Butiril-L-carnitina; Em C: Octanoil-L-carnitina; Em D: Lauroil-L-carnitina; Em E: Tetradecanoilcarnitina.

Figura 28 - Gráficos dos resultados das análises de carnitinas nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade



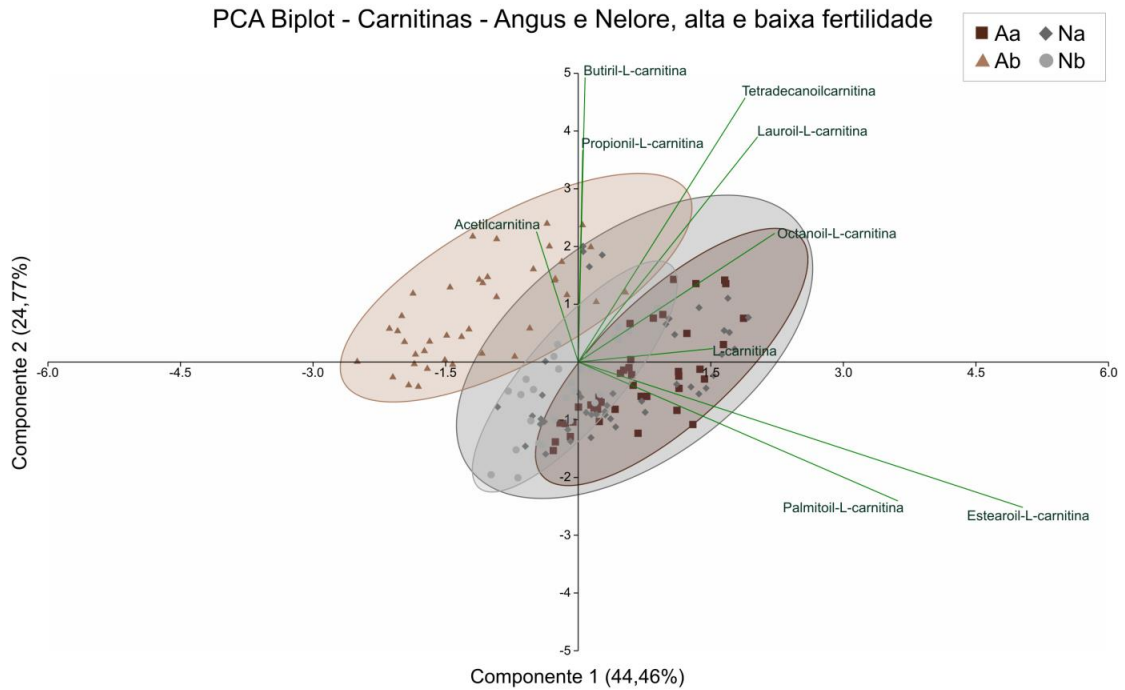
Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartis, limites mínimo e máximo (*whiskers*) e média (+ em laranja); diferenças entre os grupos são marcadas por linhas com o valor de *P* sobre as mesmas. Em A: Palmitoil-L-carnitina; Em B: Estearoil-L-carnitina; Em C: Acetilcarnitina; Em D: L-carnitina; Em E: O-Decanoil-L-carnitina (sem interação).

#### **3.4.2.2.2 Resultados de PCA e PLS-DA**

Entre as 11 carnitinas analisadas, considerando-se os de interação, nove foram utilizadas para as análises multivariadas de PCA e PLS-DA entre os quatro grupos estudados (Aa, Ab, Na e Nb). Os dados foram normalizados com transformação por log e centralização pela média antes de submetidos às análises. Nos resultados de PCA, o componente principal 1 foi responsável por 44,5% da variância e o componente principal 2, por 24,8% (Figura 29), somando 69,3%. A resposta da variância foi pouco menor na análise com classificação supervisionada de PLS-DA, com soma dos componentes de 57,9% (Figura 30A), na qual o modelo apresentou acurácia de 79% e índices de construção e predição baixos ( $R^2=0,576$  e  $Q^2=0,526$ ). Os resultados para as carnitinas mostram que não há boa resposta de variância e divisão clara entre os quatro grupos, com separação de clusters de amostras e elipses de IC apenas entre Angus de alta e baixa fertilidade. O gráfico *biplot* (figura 29) demonstra que a acetilcarnitina possui maior influência sobre o grupo Ab, enquanto os grupos de alta fertilidade estão sob maior influência de palmitoil-L-carnitina e estearoil-L-carnitina. Nos resultados de *VIP score* (Figura 30B), acetilcarnitina e tetradecanoilcarnitina apresentam valores mais altos. Os resultados das análises dos quatro grupos apontam para a necessidade de nova análise com separação das raças, para verificar maior explicação das variâncias e influência das variáveis sobre os grupos.

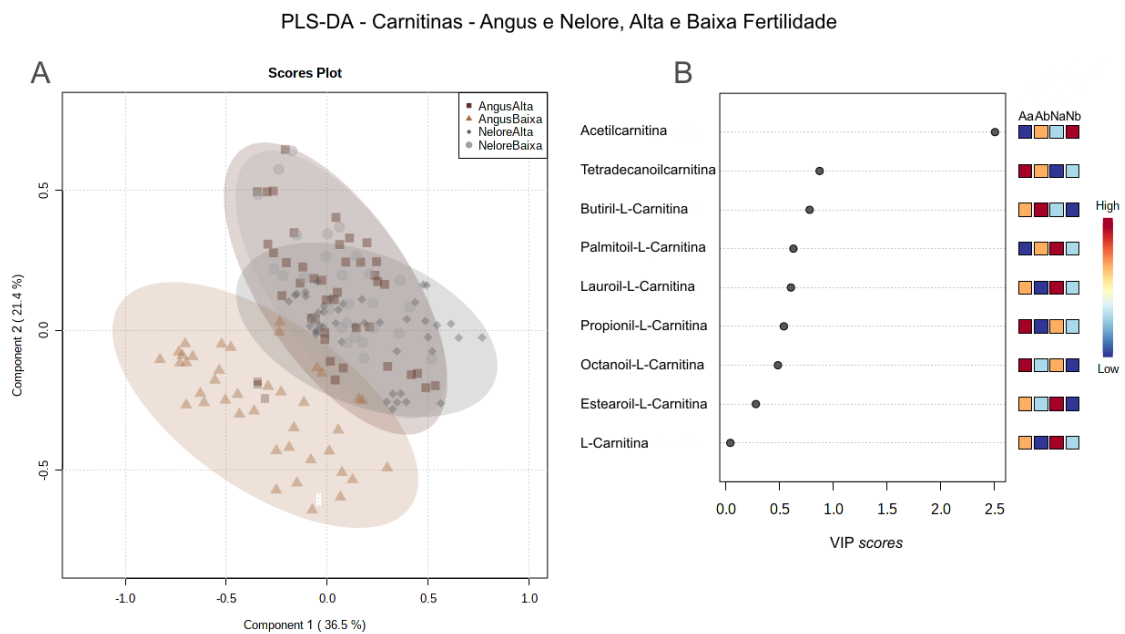
Figura 29 - PCA em apresentação *biplot* de carnitinas nos quatro grupos estudados (Aa, Ab, Na e Nb)



Fonte: Leite (2022)

Representação gráfica da separação entre os grupos Aa, Ab, Na e Nb com os componentes principais 1 e 2, que respondem por uma variância total de 69,24%. A variância explicada pelos componentes é apresentada entre parênteses. Os *clusters* das amostras dos grupos são indicados conforme a legenda e circundados por elipses de IC. As linhas e texto em verde indicam as variáveis selecionadas e a importância das mesmas (escala *eigenvalue*) na variância e separação dos grupos.

Figura 30 - PLS-DA de carnitinas nos quatro grupos estudados (Aa, Ab, Na e Nb)



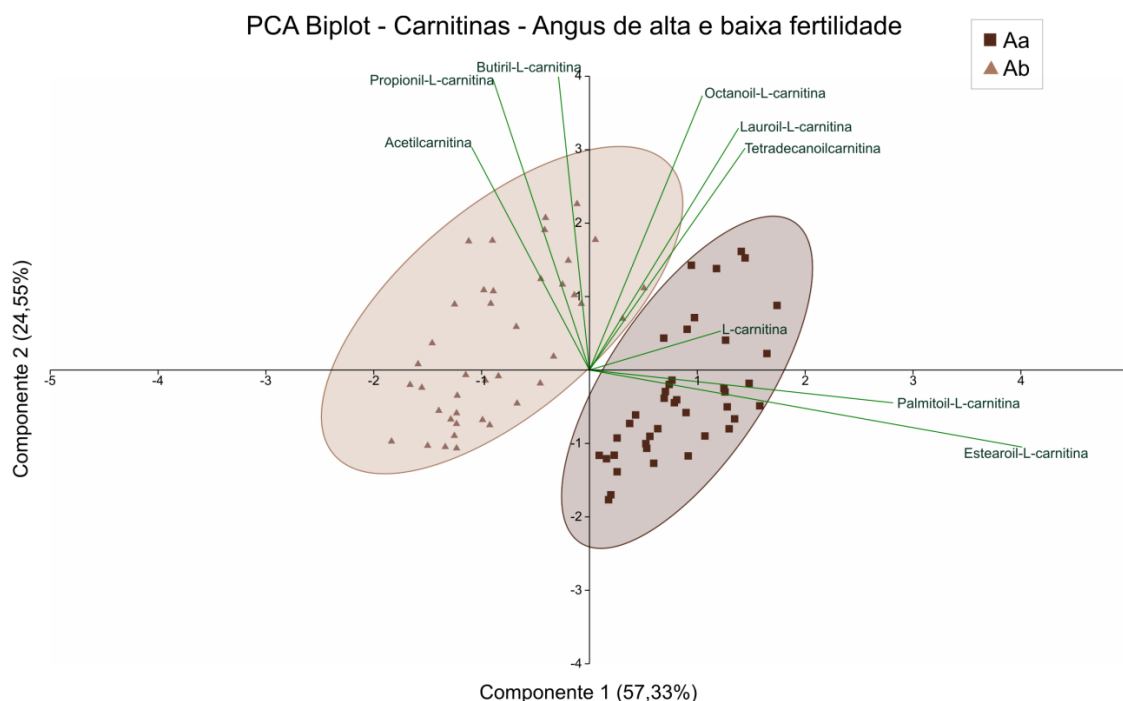
Fonte: Leite (2022)

Em A: *score plot* dos componentes selecionados (1 e 2), que respondem por 57,9% da variância; Em B: VIP score do componente 1; o score dos metabólitos listados à esquerda está relacionado com a

sua contribuição na variância explicada pelo componente; os quadrados em cores apresentados à direita indicam as concentrações relativas dos metabólito em cada grupo analisado.

Após normalização dos dados dos grupos Angus de alta e baixa fertilidade, por log e escala centralizada pela média, os mesmos foram submetidos às análises multivariadas, com separação clara entre os grupos para as carnitinas. Na PCA, o componente principal 1 foi responsável por 57,3% da variância e o componente principal 2, por 24,6%, com total de 81,9% (Figura 31). Resultado semelhante foi obtido pela PLS-DA (validação do modelo com acurácia de 97%,  $R^2=0,8683$  e  $Q^2=0,8594$ ), na qual os dois primeiros componentes respondem por 80,7% da variância (Figura 32A). Como esperado, com base nos resultados anteriores, o gráfico *biplot* (Figura 28), bem como os resultados de *VIP score* (Figura 32B), mostram que a estearoil-L-carnitina e palmitoil-L-carnitina (Angus de alta fertilidade), juntamente com a influência da propionil-L-carnitina e acetilcarnitina (Angus de baixa fertilidade), são os metabólitos com maior peso na separação dos grupos.

Figura 31 - PCA em apresentação *biplot* de carnitinas nos grupos Angus de alta e baixa fertilidade

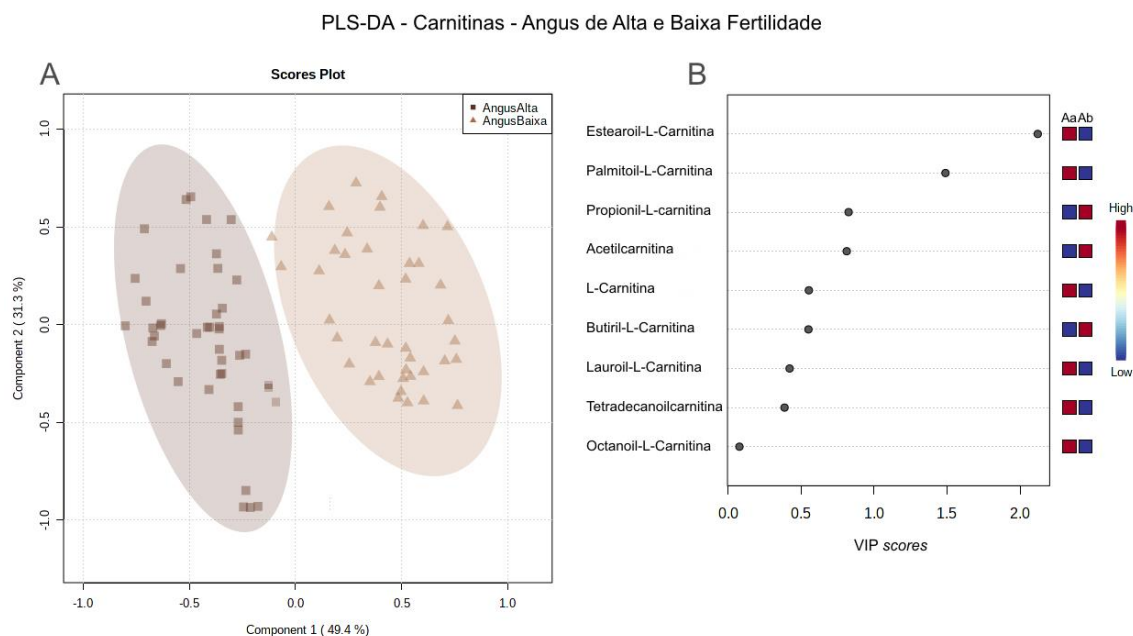


Fonte: Leite (2022)

Representação gráfica da separação entre os grupos Aa e Ab com os componentes principais 1 e 2, que respondem por uma variância total de 81,88%. A variância explicada pelos componentes é apresentada entre parênteses. Os *clusters* das amostras dos grupos são indicados conforme a legenda e circundados por elipses de IC. As linhas e texto em verde indicam as variáveis selecionadas e a importância das mesmas (escala *eigenvalue*) na variância e separação dos grupos.



Figura 32 - PLS-DA de carnitinas nos grupos Angus de alta e baixa fertilidade

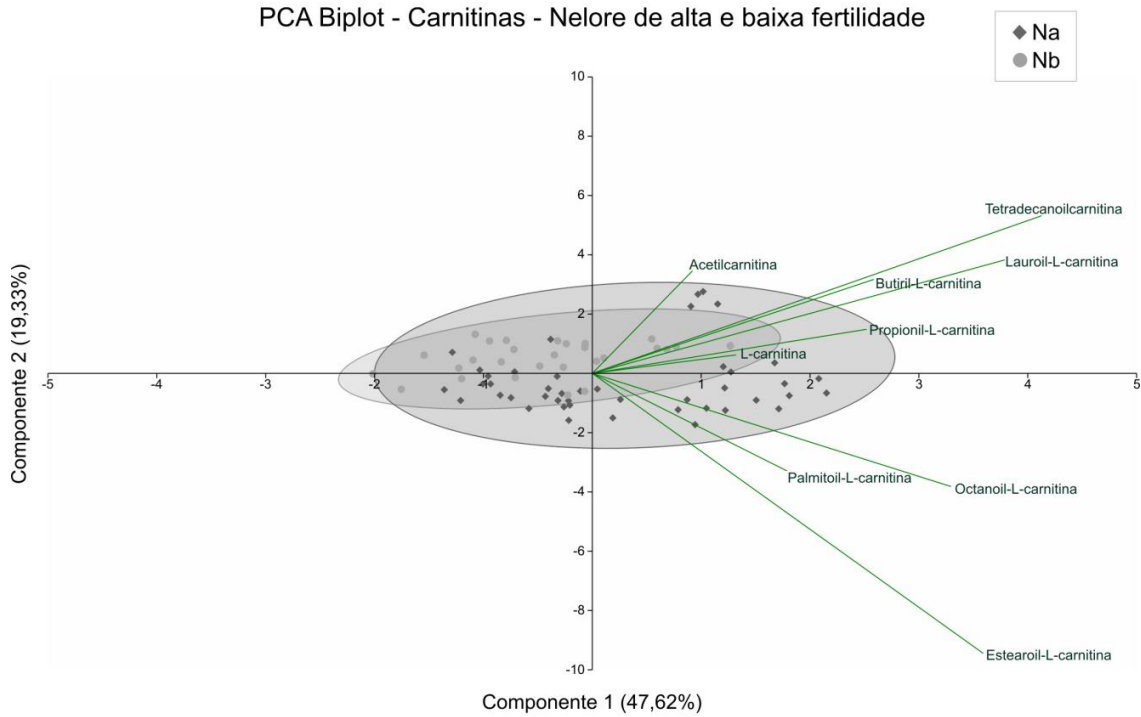


Fonte: Leite (2022)

Em A: *score plot* dos componentes selecionados (1 e 2), que respondem por 80,7% da variância; Em B: *VIP score* do componente 1; o *score* dos metabólitos listados à esquerda está relacionado com a sua contribuição na variância explicada pelo componente; os quadrados em cores apresentados à direita indicam as concentrações relativas dos metabólito em cada grupo analisado.

Para as análises dos grupos da raça Nelore, os dados foram normalizados por log e escala automática antes de submetidos às análises multivariadas, que não resultaram em separação entre os dois grupos. Na PCA, o componente principal 1 foi responsável por 47,6% da variância e o componente principal 2, por 19,3%, com total de 66,9% (Figura 33). Para PLS-DA (validação do modelo com acurácia de 93%,  $R^2=0,711$  e  $Q^2=0,652$ ), os dois primeiros componentes, respondem por 62,9% da variância (Figura 34A). Apesar de não haver separação entre os grupos, os resultados de *VIP score* (Figura 34B), apontam palmitoil-L-carnitina e octanoil-L-carnitina como variáveis importantes de projeção. Essas duas carnitinas, juntamente com a estearoil-L-carnitina, possuem influência sobre a maior parte das amostras do grupo Nelore de alta fertilidade, como pode ser verificado no gráfico *bitplot* (Figura 30).

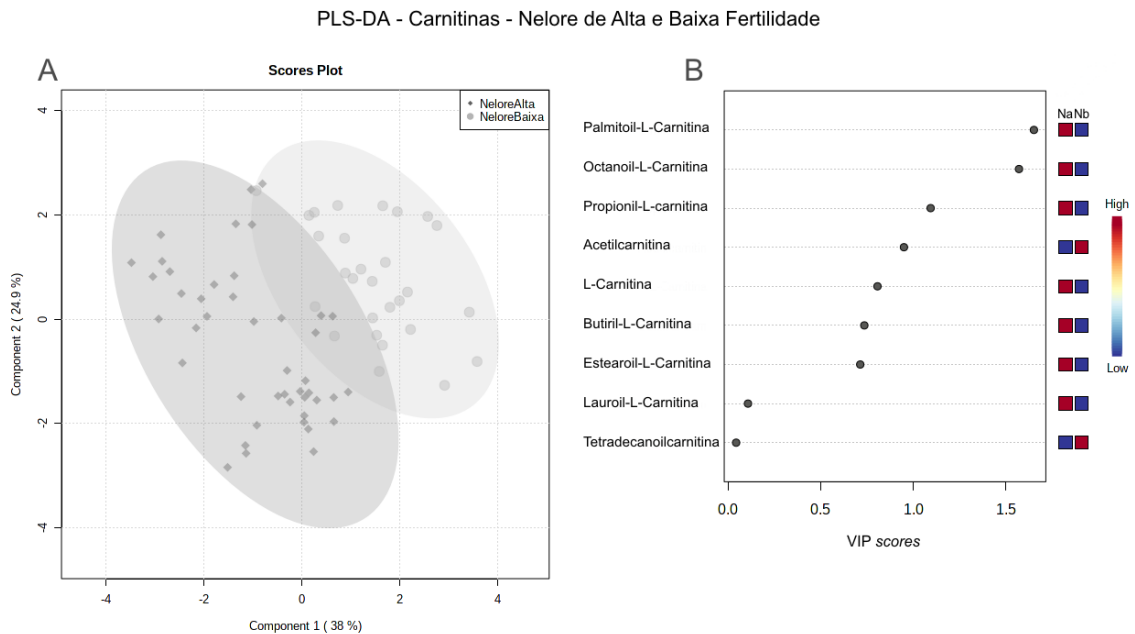
Figura 33 - PCA em apresentação *biplot* de carnitinas nos grupos Nelore de alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

Representação gráfica da separação entre os grupos Na e Nb com os componentes principais 1 e 2, que respondem por uma variância total de 66,9%. A variância explicada pelos componentes é apresentada entre parênteses. Os *clusters* das amostras dos grupos são indicados conforme a legenda e circundados por elipses de IC. As linhas e texto em verde indicam as variáveis selecionadas e a importância das mesmas (escala *eigenvalue*) na variância e separação dos grupos.

Figura 34 - PLS-DA de carnitinas nos grupos Nelore de alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

Em A: *score plot* dos componentes selecionados (1 e 2), que respondem por 62,9% da variância; Em B: *VIP score* do componente 1; o *score* dos metabólitos listados à esquerda está relacionado com a

sua contribuição na variância explicada pelo componente; os quadrados em cores apresentados à direita indicam as concentrações relativas dos metabólito em cada grupo analisado.

### **3.4.2.3 Peptídeos, aminoácidos e derivados**

Peptídeos, pequenas cadeias de aminoácidos unidos por ligações peptídicas, possuem funções muito abrangentes. Da mesma forma, as funções dos aminoácidos vão além da síntese proteica e, como seus derivados, são metabólitos imprescindíveis para a sobrevivência celular, atuando, por exemplo, em ciclos de produção de energia, metabolismo de lipídios e carboidratos, processos antioxidantes, entre outros. Nesta categoria, os metabólitos detectados com PID foram normalizados pela área e concentração do mesmo, e seus dados convertidos em concentração em ng/mL. Os metabólitos detectados sem PID foram normalizados pela área do pico de sulfona de metionina (derivado de aminoácido) de cada amostra, e seus dados são apresentados em *area ratio*. Os resultados da classe de peptídeos, aminoácidos e seus derivados, abrangem as diferenças entre os grupos estudados (Aa, Ab, Na e Nb) obtidas pela análise fatorial, de variáveis com e sem interação, e as análises multivariadas de PCA e PLSA, os quais são apresentados abaixo em dois tópicos distintos.

#### **3.4.2.3.1 Resultados de interação e diferenças entre os grupos**

Entre os resultados de peptídeos, aminoácidos e derivados analisados, foi possível observar interação (Tabela 16) de fertilidade (Alta vs Baixa) e raça (Angus vs Nelore) apenas em aminoácidos, com diferenças entre os grupos, tanto no efeito da raça sobre a fertilidade (Tabela 17) quanto da fertilidade sobre a raça (Tabela 18). Os resultados de metabólitos que não apresentaram interação foram divididos em efeito fertilidade (Tabela 19) e efeito raça (Tabela 20). Com relação à classificação de aminoácidos como essenciais e não essenciais apresentada na tabela 16, os mesmos foram identificados de acordo com as necessidades nutricionais dos ruminantes (ALVES, 2004).

Tabela 16 - Resultados da análise de interação de fertilidade (Alta vs Baixa) e raça (Angus vs Nelore) de peptídeos, aminoácidos e derivados analisados em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado

CLASSE	PEPTÍDEOS, AMINOÁCIDOS E DERIVADOS COM PID (concentração em ng/mL)	Valores de P		
		Raça	Fertilidade	Raça*Fertilidade
tripeptídeo	Glutaciona	0,0046	<,0001	0,7579
aa não essencial	Ácido aspártico	0,0023	<,0001	0,0504
aa não essencial	Ácido glutâmico	<,0001	<,0001	0,0226
aa não essencial	Alanina	<,0001	0,0100	0,1402
aa essencial	Arginina	0,0692	0,5540	0,0513
aa essencial	Fenilalanina	<,0001	0,9693	0,2880
aa não essencial	Glicina	<,0001	<,0001	<,0001
aa essencial	Isoleucina	<,0001	0,7071	0,0049
aa essencial	Leucina	0,0018	0,2567	0,2303
aa essencial	Metionina	0,9791	<,0001	<,0001
aa não essencial	Prolina	<,0001	0,2770	<,0001
aa não essencial	Serina	0,0001	0,5035	0,0476
aa essencial	Tirosina	0,0288	0,9610	0,0590
aa essencial	Treonina	0,6578	0,0290	0,0005
aa essencial	Triptofano	0,2465	0,3252	0,7692
aa essencial	Valina	0,0002	0,7589	0,0011
derivado (metionina) e PID	Sulfona de metionina	<,0001	0,3461	0,2572

CLASSE	PEPTÍDEOS, AMINOÁCIDOS E DERIVADOS SEM PID (area ratio)	Raça	Fertilidade	Raça*Fertilidade
aa não essencial	Citrulina	<,0001	0,3326	0,1801
aa não essencial	Glutamina	<,0001	<,0001	0,7004
aa não essencial	Homocisteína		Só angus Só fertilidade	
derivado (glicina e arginina)	Creatina	<,0001	<,0001	0,4311
derivado (glicina)	Dimetilglicina	0,0073	<,0001	0,5824

Fonte: Leite (2022)

Metabólitos detectados com PID foram normalizados pelos mesmos e seus dados convertidos em concentração em ng/mL. Metabólitos detectados sem PID foram normalizados com a sulfona de metionina como padrão interno e, portanto, seus dados estão em *area ratio*. Valores de  $P < 0,1$  foram considerados como interação entre os fatores e são apresentados em vermelho.

Tabela 17 - Efeito do grupo genético (Angus e Nelore) na fertilidade (alta e baixa) de aminoácidos analisados em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado

AMINOÁCIDOS Concentração (ng/mL)	ALTA FERTILIDADE		P	BAIXA FERTILIDADE		P
	ANGUS (n=40)	NELORE (n=44)		ANGUS (n=40)	NELORE (n=28)	
	Média±SEM	Média±SEM		Média±SEM	Média±SEM	
Ácido aspártico	7,90±0,31	6,23±0,18	<,0001	5,23±0,27	4,92±0,26	0,5188
Ácido glutâmico	12,34±0,56	6,54±0,29	<,0001	8,35±0,41	5,44±0,27	<,0001
Arginina	383,52±25,08	320,50±10,21	0,1141	322,01±12,64	345,98±15,48	0,2463
Glicina	6,48±0,35	7,01±0,34	0,392	10,84±0,53	6,47±0,37	<,0001
Isoleucina	156,28±8,49	168,10±6,51	0,1165	137,39±6,63	201,47±11,87	<,0001
Metionina	45,30±3,52	31,46±1,87	0,0011	23,23±1,84	32,97±3,31	0,0057
Prolina	55,40±2,85	62,95±2,14	0,0231	41,80±2,19	72,62±2,77	<,0001
Serina	10,92±0,81	11,35±0,41	0,1806	9,91±0,62	13,15±0,52	<,0001
Tirosina	176,56±14,02	171,53±8,47	0,8107	153,90±10,66	200,85±14,56	0,011
Treonina	7,70±0,50	5,90±0,18	0,0035	6,01±0,14	6,74±0,27	0,031
Valina	174,41±8,77	179,22±8,00	0,6863	147,80±9,40	211,24±7,58	<,0001

Fonte: Leite (2022)

Resultados em média ± SEM e valor de P. Valores de P<0,05, são apresentados em vermelho. Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

Tabela 18 - Efeito da fertilidade (alta e baixa) no grupo genético (Angus e Nelore) de aminoácidos analisados em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado

AMINOÁCIDOS Concentração (ng/mL)	ANGUS		P	NELORE		P
	ALTA FERTILIDADE (n=40)	BAIXA FERTILIDADE (n=40)		ALTA FERTILIDADE (n=44)	BAIXA FERTILIDADE (n=28)	
	Média±SEM	Média±SEM		Média±SEM	Média±SEM	
Ácido aspártico	7,90±0,31	5,23±0,27	<,0001	6,23±0,18	4,92±0,26	0,0002
Ácido glutâmico	12,34±0,56	8,35±0,41	<,0001	6,54±0,29	5,44±0,27	0,0073
Arginina	383,52±25,08	322,01±12,64	0,1157	320,50±10,21	345,98±15,48	0,2144
Glicina	6,48±0,35	10,84±0,53	<,0001	7,01±0,34	6,47±0,37	0,3508
Isoleucina	156,28±8,49	137,39±6,63	0,1051	168,10±6,51	201,47±11,87	0,0119
Metionina	45,30±3,52	23,23±1,84	<,0001	31,46±1,87	32,97±3,31	0,9847
Prolina	55,40±2,85	41,80±2,19	0,0003	62,95±2,14	72,62±2,77	0,0067
Serina	10,92±0,81	9,91±0,62	0,4377	11,35±0,41	13,15±0,52	0,0055
Tirosina	176,56±14,02	153,90±10,66	0,2123	171,53±8,47	200,85±14,56	0,1422
Treonina	7,70±0,50	6,01±0,14	0,0071	5,90±0,18	6,74±0,27	0,0113
Valina	174,41±8,77	147,80±9,40	0,0417	179,22±8,00	211,24±7,58	0,008

Fonte: Leite (2022)

Resultados em média ± SEM e valor de P. Valores de P<0,05, são apresentados em vermelho. Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

Tabela 19 - Efeito fertilidade (alta e baixa) de peptídeos, aminoácidos e derivados analisados em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado

PEPTÍDEOS, AMINOÁCIDOS E DERIVADOS COM PID (concentração em ng/mL)	ALTA FERTILIDADE (n=84)	BAIXA FERTILIDADE (n=68)	P
	Média±SEM	Média±SEM	
Glutaciona	89,30±2,67	144,25±2,25	<.0001
Alanina	12,02±0,51	10,93±0,39	0,0100
Fenilalanina	157,45±6,46	152,96±6,48	0,9693
Leucina	353,67±14,71	367,78±16,14	0,2567
Triptofano	46,11±1,60	49,19±2,14	0,3252
Sulfona de metionina	5,79±0,24	5,26±0,24	0,3461
PEPTÍDEOS, AMINOÁCIDOS E DERIVADOS SEM PID (area ratio)	ALTA FERTILIDADE (n=84)	BAIXA FERTILIDADE (n=68)	P
	Média±SEM	Média±SEM	
Glutaciona oxidada	0,38±0,02	0,70±0,04	<.0001
Citrulina	3,40±0,19	3,73±0,19	0,3326
Glutamina	11,19±0,62	9,08±0,43	<.0001
Homocisteína (só Angus)	0,04±0,003	0,08±0,003	<.0001
Creatina (derivado)	8,91±0,70	15,95±1,72	<.0001
Dimetilglicina (derivado)	47,16±1,93	59,06±2,07	<.0001

Fonte: Leite (2022)

Metabólitos detectados com PID foram normalizados pelos mesmos e seus dados convertidos em concentração em ng/mL. Metabólitos detectados sem PID foram normalizados com a sulfona de metionina como padrão interno e, portanto, seus dados estão em *area ratio*. Resultados em média ± SEM e valor de P. Valores de  $P < 0,05$ , são apresentados em vermelho. Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

Tabela 20 - Efeito raça (Angus e Nelore) de peptídeos, aminoácidos e derivados analisados em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado

PEPTÍDEOS, AMINOÁCIDOS E DERIVADOS COM PID (concentração em ng/mL)	ANGUS (n=80)	NELORE (n=72)	P
	Média±SEM	Média±SEM	
Glutaciona	108,65±4,19	120,20±3,75	0,0046
Alanina	13,62±0,49	9,21±0,26	<.0001
Fenilalanina	139,90±6,39	172,71±6,01	<.0001
Leucina	333,03±14,90	389,93±15,16	0,0018
Triptofano	46,59±1,94	48,51±1,76	0,2465
Sulfona de metionina	4,42±0,18	6,81±0,22	<.0001
PEPTÍDEOS, AMINOÁCIDOS E DERIVADOS SEM PID (area ratio)	ANGUS (n=80)	NELORE (n=72)	P
	Média±SEM	Média±SEM	
Glutaciona oxidada	0,58±0,03	0,46±0,03	0,0230
Citrulina	4,49±0,17	2,50±0,12	<.0001
Glutamina	12,68±0,61	7,54±0,28	<.0001
Creatina (derivado)	18,66±1,33	4,72±0,21	<.0001
Dimetilglicina (derivado)	57,15±2,25	47,30±1,72	0,0073

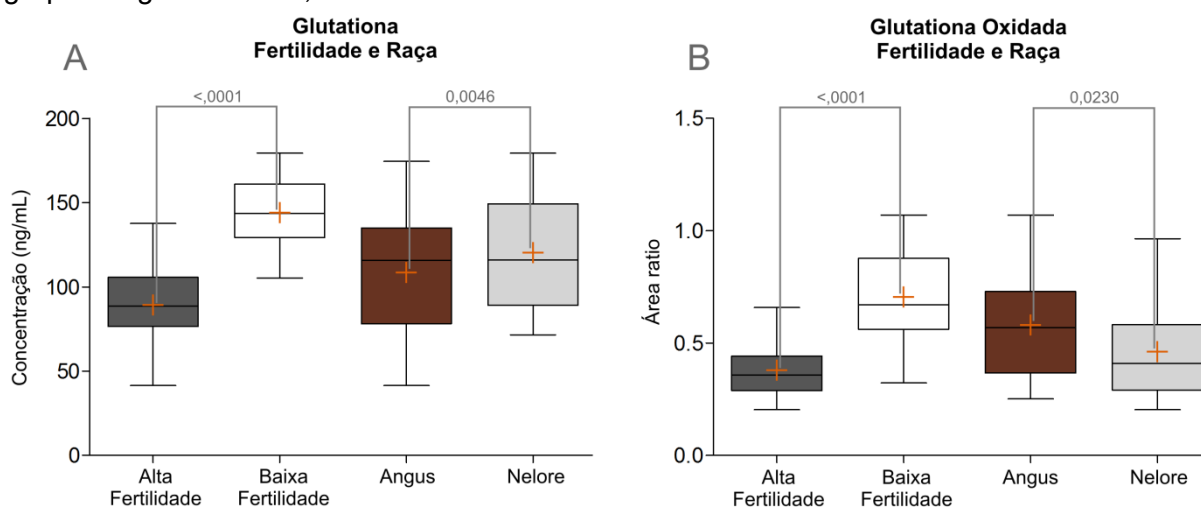
Fonte: Leite (2022)

Metabólitos detectados com PID foram normalizados pelos mesmos e seus dados convertidos em concentração em ng/mL. Metabólitos detectados sem PID foram normalizados com a sulfona de metionina como padrão interno e, portanto, seus dados estão em *area ratio*. Resultados em média ±

SEM e valor de  $P$ . Valores de  $P < 0,05$ , são apresentados em vermelho. Médias  $\pm$  SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

Entre a classe de peptídeos, apenas a glutatona (GSH) e a sua forma oxidada (GSSG) foram detectadas nas amostras dos grupos estudados, ambos sem interação. A glutatona, tripeptídeo formado pelos aminoácidos ácido glutâmico, cisteína e glicina, bem como a glutatona oxidada, dímero da glutatona formado por uma ligação dissulfeto, são metabólitos que atuam de forma importante em processos antioxidantes celulares. Foi detectada uma maior quantidade de ambos nos animais de baixa fertilidade, em comparação com os de alta fertilidade (Tabela 19 e Figuras 35A e B). Houve também diferença na comparação entre raças, com uma maior concentração de glutatona na raça Nelore (Tabela 20 e Figuras 35A) e de sua forma oxidada na raça Angus (Tabela 20 e Figuras 35B).

Figura 35 - Gráficos dos resultados das análises de glutatona e glutatona oxidada nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartil, limites mínimo e máximo (*whiskers*) e média (+ em laranja); diferenças entre os grupos são marcadas por linhas com o valor de  $P$  sobre as mesmas. Em A: glutatona (efeitos fertilidade e raça); Em B: glutatona oxidada (efeitos fertilidade e raça).

Entre os aminoácidos com interação, os ácidos aspártico (aspartato) e glutâmico (glutamato) possuem papel celular importante não apenas na síntese de proteínas, atuando, por exemplo, na síntese de outros aminoácidos e no metabolismo energético. Para estes dois aminoácidos, os grupos de alta fertilidade de ambas as raças apresentaram maior concentração em comparação com os respectivos grupos de baixa fertilidade (Tabela 18 e Figuras 36A e B), e, dentro dos

grupos de alta fertilidade, a raça Angus teve maior concentração em comparação ao Nelore (Tabela 17 e Figuras 36A e B). Para o ácido glutâmico, foi observado, nos grupos de baixa fertilidade, maior concentração no Angus em comparação com Nelore (Tabela 17 e Figura 36B). Quanto à prolina, que é sintetizada a partir do ácido glutâmico e, portanto, cujo catabolismo leva à formação do mesmo, os grupos da raça Nelore registraram maior concentração em comparação aos respectivos grupos da raça Angus (Tabela 17 e Figura 36F). Entretanto, na comparação dentro da mesma raça, foi observada maior concentração de prolina no Angus de alta em relação ao de baixa fertilidade e o inverso na raça Nelore (Tabela 18 e Figura 36F).

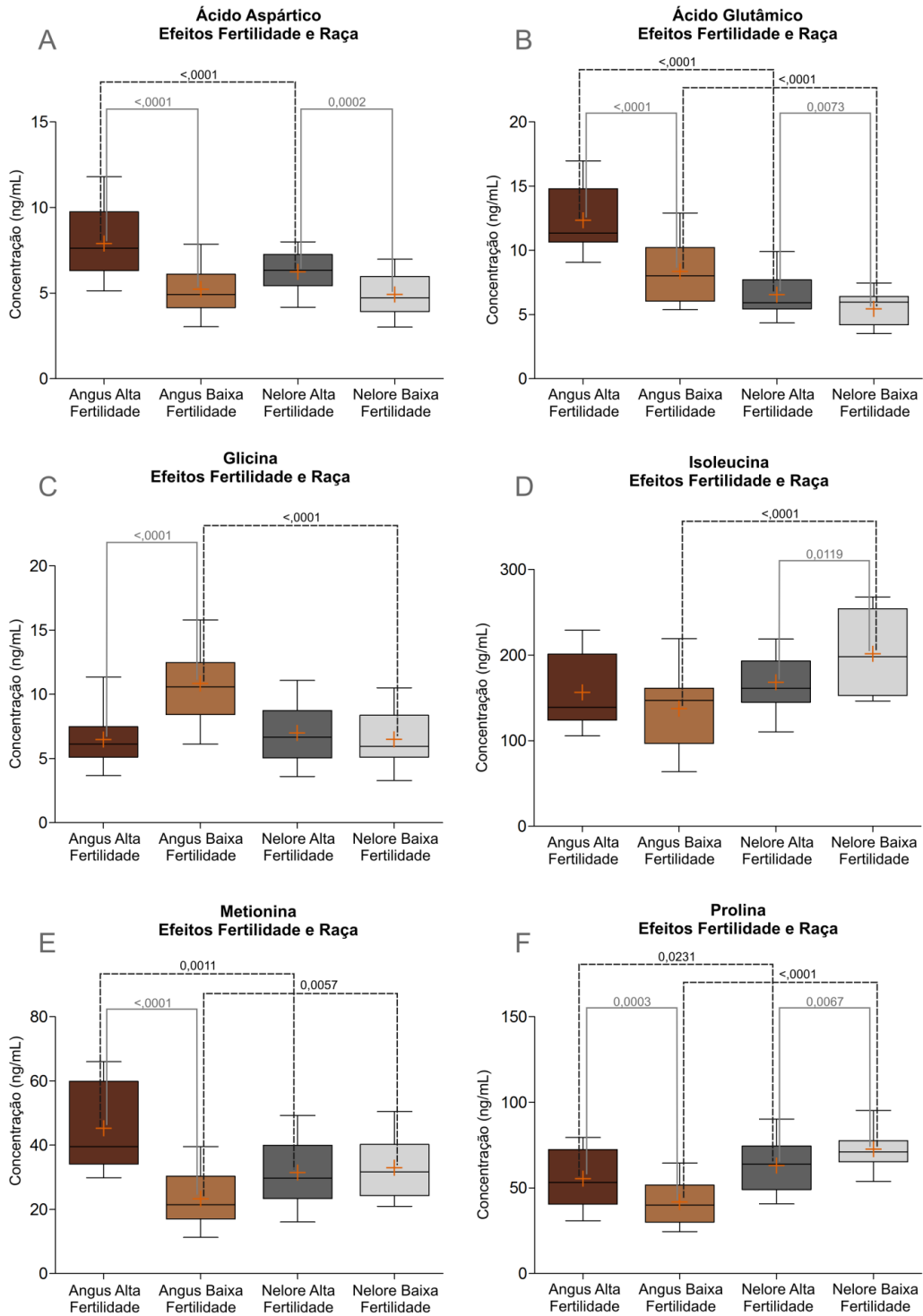
O grupo Angus de baixa fertilidade apresentou mais glicina, importante precursor de muitas macromoléculas e com atuação no metabolismo energético, em comparação com os grupos Nelore de baixa fertilidade (Tabela 17 e Figura 36C) e Angus de alta fertilidade (Tabela 18 e Figura 36C). No entanto, o inverso é observado para a metionina, com o grupo Angus de baixa fertilidade com menor concentração, tanto em comparação com o Angus de alta (Tabela 18 e Figura 36E) quanto com o Nelore de baixa fertilidade (Tabela 17 e Figura 36E). Para este aminoácido, o Angus de alta fertilidade apresentou maior concentração também em relação ao grupo correspondente da raça Nelore (Tabela 17 e Figura 36E). Derivada da glicina e necessária para síntese proteica, metabolismo de ácidos graxos e com grande presença em membranas plasmáticas, a serina foi identificada em maior concentração no grupo Nelore de baixa fertilidade, em comparação com os grupos Nelore de alta fertilidade (Tabela 18 e Figura 37A) e Angus de baixa fertilidade (Tabela 17 e Figura 37A). O mesmo foi observado em relação à treonina (Tabelas 17 e 18 e Figura 37C), aminoácido que, além da síntese proteica, é importante no metabolismo de ácidos graxos e na formação de Acetil-CoA. Também foi observada maior concentração de treonina no grupo Angus de alta fertilidade em comparação com os grupos Angus de baixa fertilidade (Tabela 18 e Figura 37C) e Nelore de alta fertilidade (Tabela 17 e Figura 37C). O grupo Nelore de baixa fertilidade apresentou maior concentração de tirosina, aminoácido com papel importante na síntese de várias macromoléculas, em comparação com os Angus de baixa fertilidade (Tabela 17 e Figura 37B).

Entre os aminoácidos detectados, valina, leucina e a isoleucina são similares por serem aminoácidos de cadeia ramificada (*branched chain amino acids* - BCAAs), no entanto, apesar da semelhança estrutural e de estarem relacionados com vias de



metabolismo energético, diferem na classe de metabólitos em que atuam. Valina (atua apenas sobre carboidratos), e isoleucina (atua tanto em carboidratos quanto em ácidos graxos), foram detectadas em maior concentração no grupo Nelore de baixa fertilidade, tanto em relação ao Angus de baixa (Tabela 17 e Figuras 37D e 36D) quanto ao Nelore de alta fertilidade (Tabela 18 e Figuras 37D e 36D). Para a valina, também foi observada uma maior quantidade no grupo Angus de alta fertilidade em comparação com o Angus de baixa fertilidade (Tabela 18 e Figura 37D). No caso da leucina, a qual atua apenas na via metabólica de ácidos graxos, não houve interação, mas a raça Nelore também apresentou maior concentração em relação ao Angus (Tabela 20 e Figura 38E).

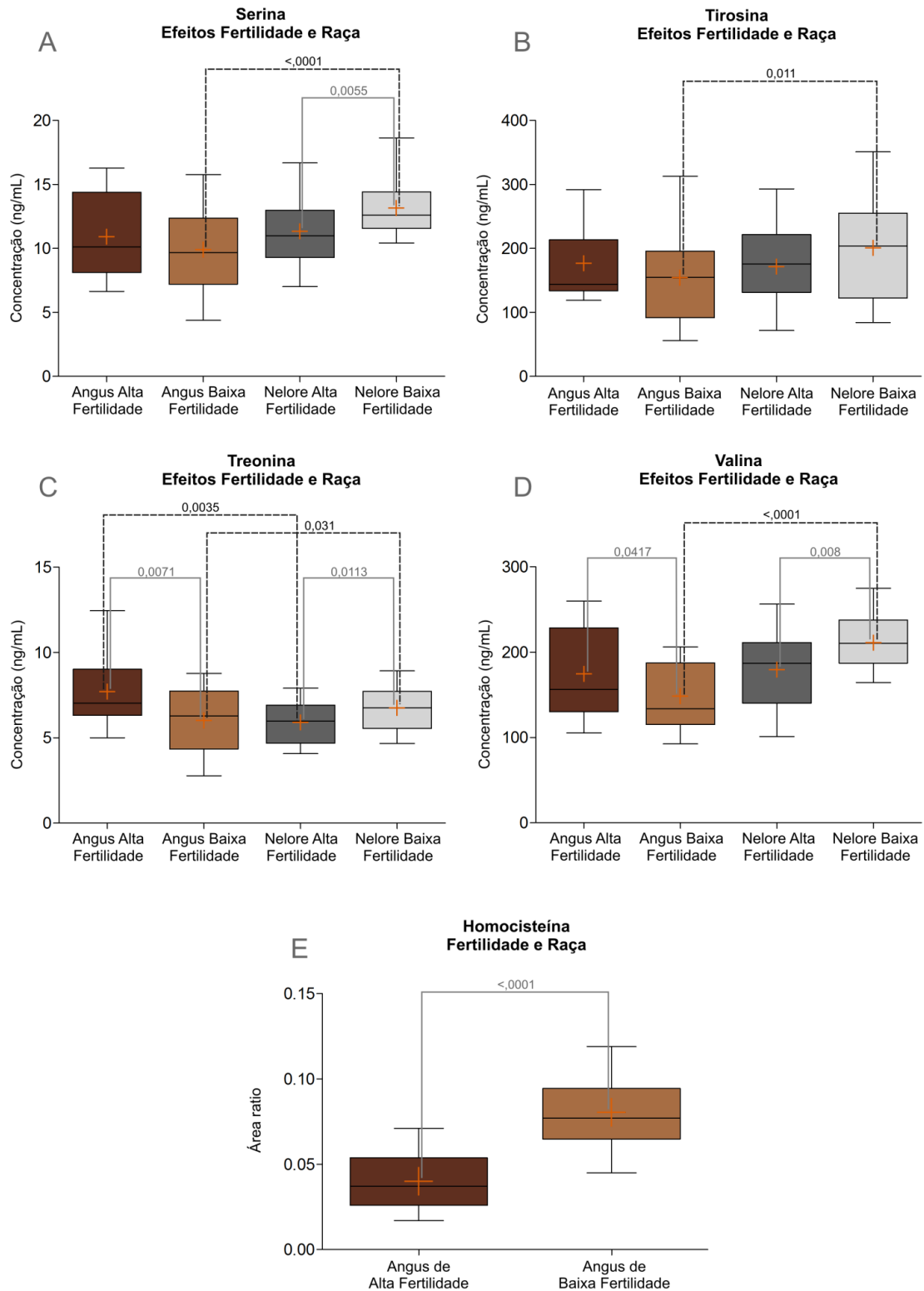
Figura 36 - Gráficos dos resultados das análises de aminoácidos nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartis, limites mínimo e máximo (*whiskers*) e média (+ em laranja); diferenças entre os grupos são marcadas por linhas com o valor de *P* sobre as mesmas. Em A: ácido aspártico (aspartato, interação fertilidade\*raça); Em B: ácido glutâmico (glutamato, interação fertilidade\*raça); Em C: glicina (interação fertilidade\*raça); Em D: Isoleucina (interação fertilidade\*raça); Em E: metionina (interação fertilidade\*raça); em F: prolina (interação fertilidade\*raça).

Figura 37 - Gráficos dos resultados das análises de aminoácidos nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade

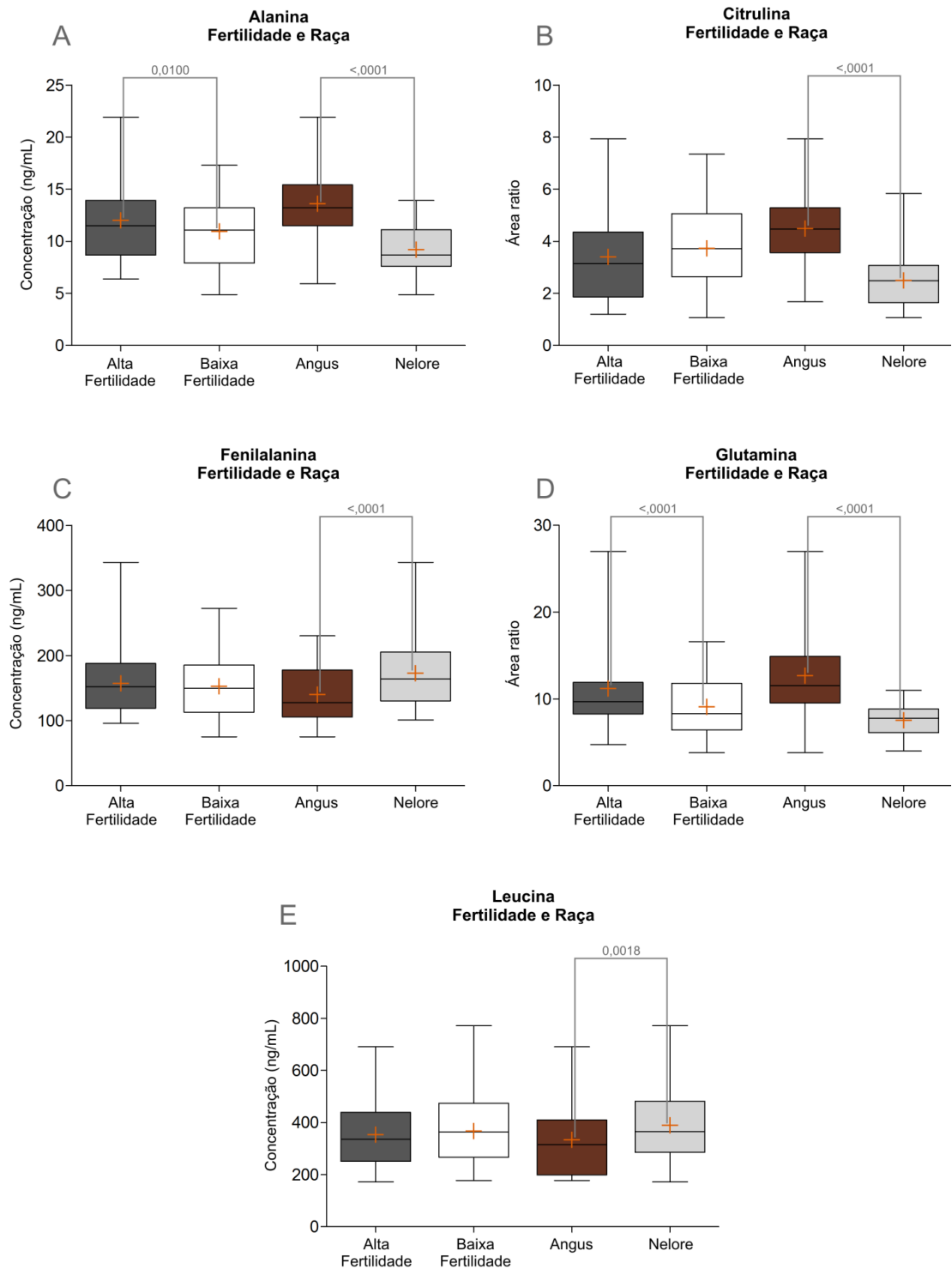


Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartis, limites mínimo e máximo (*whiskers*) e média (+ em laranja); diferenças entre os grupos são marcadas por linhas com o valor de *P* sobre as mesmas. Em A: serina (interação fertilidade\*raça); Em B: tirosina (interação fertilidade\*raça); Em C: treonina (interação fertilidade\*raça); Em D: valina (interação fertilidade\*raça); Em E: homocisteína (detectada apenas na raça Angus).

Com resultados sem interação, a alanina, um dos aminoácidos mais utilizados na síntese proteica, atuando ainda no metabolismo de açúcares e ácidos orgânicos, foi detectada em maior concentração nos animais de alta fertilidade (Tabela 19 e Figura 38A), bem como na raça Angus em comparação com Nelore (Tabela 20 e Figura 38A). O mesmo ocorreu com a glutamina (Tabelas 19 e 20 e Figura 38D), aminoácido que atua no controle da peroxidação lipídica em membranas e na inibição da formação de óxido nítrico (NO<sup>•</sup>). A citrulina, que entre outras funções também age na inibição da formação de NO<sup>•</sup>, foi detectada em maior concentração na raça Angus (Tabela 20 e Figura 38B). Já a fenilalanina, com papel importante na biossíntese de outros aminoácidos, foi detectada em maior quantidade em animais da raça Nelore (Tabela 20 e Figura 38C). Por fim, a homocisteína, formada a partir da demetilação da metionina, foi detectada apenas na raça Angus, com maior concentração em animais de baixa fertilidade (Tabela 19 e Figura 37E).

Figura 38 - Gráficos dos resultados das análises de aminoácidos nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade

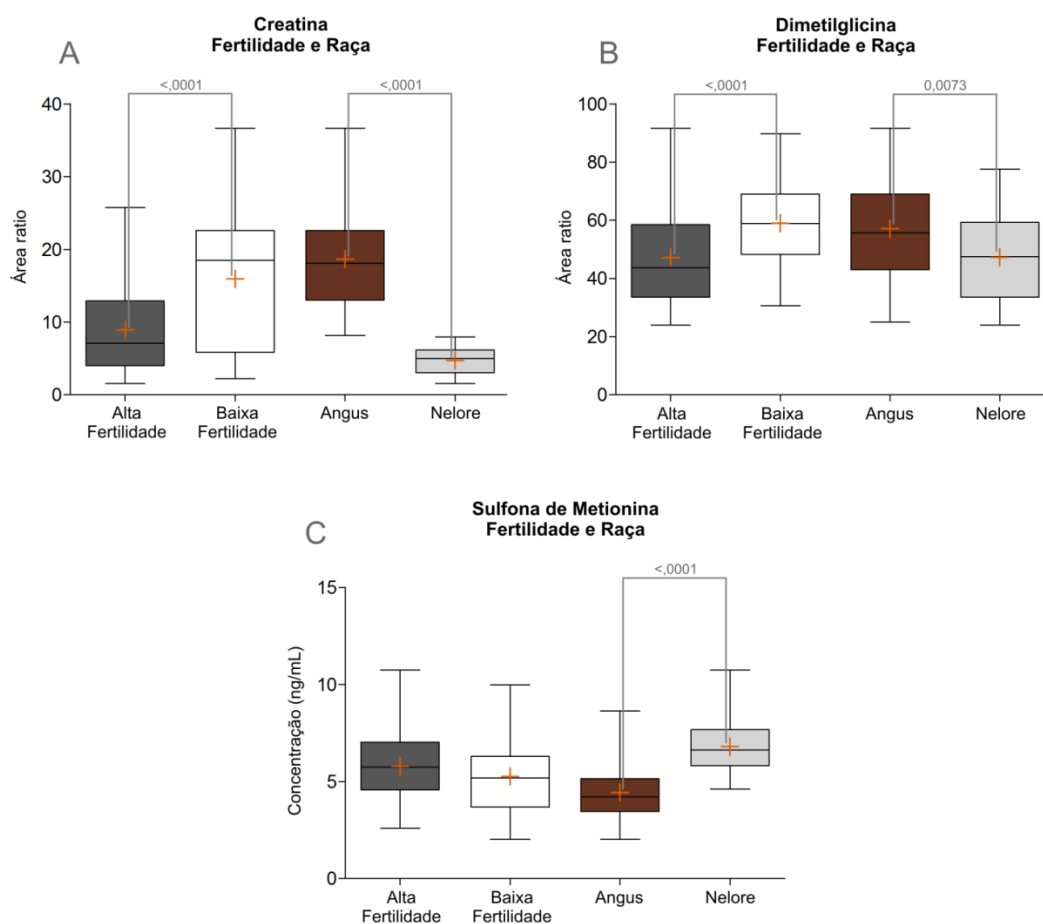


Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartis, limites mínimo e máximo (*whiskers*) e média (+ em laranja); diferenças entre os grupos são marcadas por linhas com o valor de *P* sobre as mesmas. Aminoácidos sem interação (efeito fertilidade e efeito raça) Em A: alanina; Em B: citrulina; Em C: fenilalanina; Em D: glutamina; Em E: leucina.

Três derivados de aminoácidos foram detectados, para os quais não houve interação fertilidade\*raça. Entre estes, a creatina é um importante metabólito no armazenamento de energia que, quando fosforilado, serve de doador de grupo fosfato para a conversão de ADP em ATP. Os animais de baixa fertilidade apresentaram maior concentração de creatina que os de alta fertilidade (Tabela 19 e Figura 39A), enquanto houve maior presença também nos animais da raça Angus (Tabela 20 e Figura 39A). O mesmo resultado foi observado para a dimetilglicina (Tabelas 19 e 20 e Figura 39B), a qual resulta da metabolização de colina em glicina e é também subproduto do metabolismo da homocisteína. A sulfona de metionina, usada como PID e resultante da oxidação de enxofre presente na metionina, foi detectada em maior quantidade na raça Nelore (Tabela 20 e Figura 39C).

Figura 39 - Gráficos dos resultados das análises de derivados de aminoácidos nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade



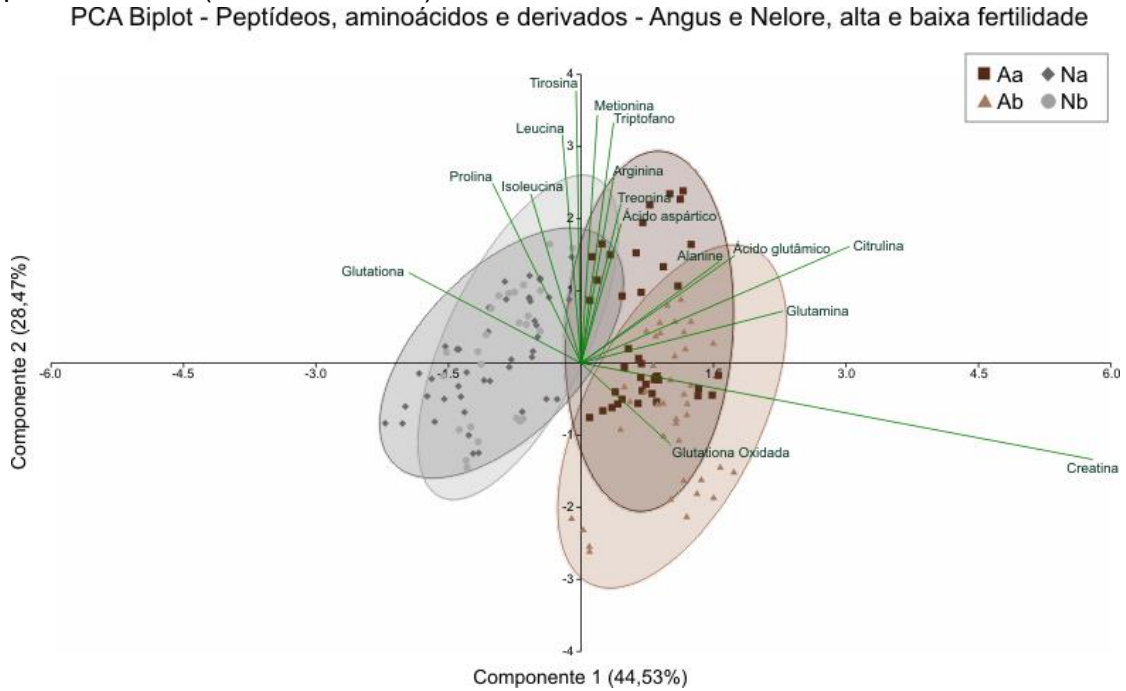
Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartil, limites mínimo e máximo (*whiskers*) e média (+ em laranja); diferenças entre os grupos são marcadas por linhas com o valor de *P* sobre as mesmas. Metabólitos sem interação (efeito fertilidade e efeito raça). Em A: creatina; Em B: dimetilglicina; Em C: sulfona de metionina.

### 3.4.2.3.2 Resultados de PCA e PLS-DA

Na classe de peptídeos, aminoácidos e derivados, após análises iniciais, 20 metabólitos foram utilizados para PLS-DA, número reduzido para 16 no modelo de PCA para as análises com os quatro grupos estudados (Aa, Ab, Na e Nb). Os dados foram normalizados com transformação por log e escala de Pareto (centralização pela média e divisão pela raiz quadrada do desvio padrão de cada variável). Nos resultados de PCA, o componente principal 1 foi responsável por 40,5% da variância e o componente principal 2, por 28,5% (Figura 40), somando 69%. Na análise com classificação supervisionada de PLS-DA a soma dos componentes utilizados (1 e 3) foi de apenas 46,1% (Figura 41A). O modelo utilizado teve acurácia de 81% e índices de construção e predição bons ( $R^2=0,815$  e  $Q^2= 0,799$ ). Em ambos se observa uma separação dos clusters de amostras entre as raças, sem separação entre os grupos de alta e baixa fertilidade. Há, no entanto, separação de *clusters* de amostras e elipses de IC entre os grupos Angus e Nelore de baixa fertilidade. Nos resultados de VIP score, creatina (derivado de aminoácido), ácido glutâmico, glutamina e citrulina apresentam os maiores escores, com maior influência portanto na separação entre as raças (Figura 41B). Esta influência pode ser observada ainda no gráfico *biplot* (Figura 40), com a creatina, glutamina e citrulina com maior influência sobre a raça Angus, e glutatona, prolina e isoleucina sobre a raça Nelore.

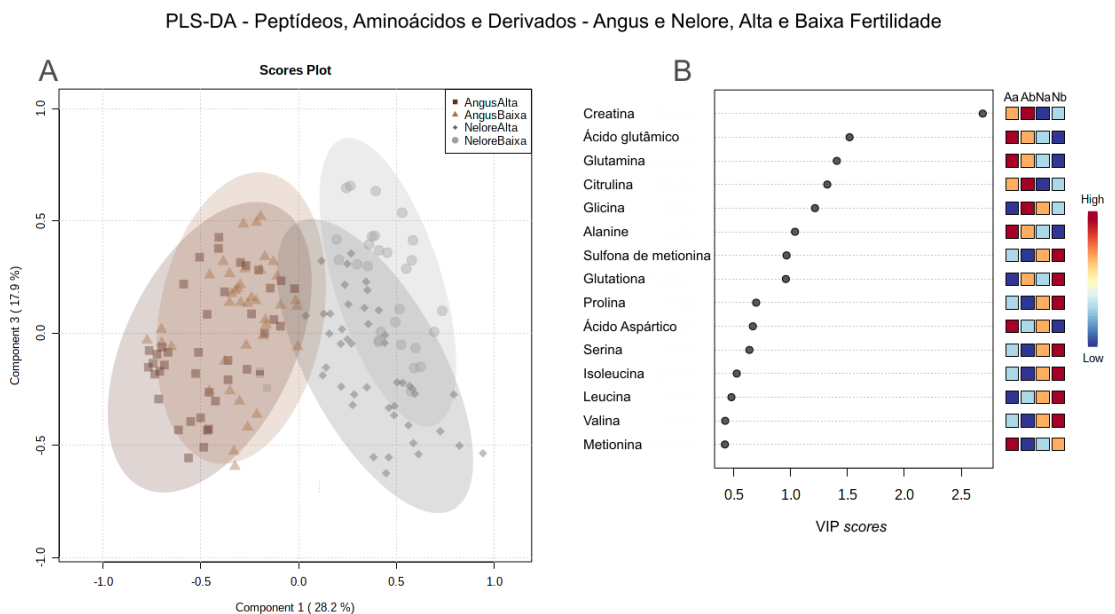
Figura 40 - PCA em apresentação *biplot* de peptídeos, aminoácidos e derivados nos quatro grupos estudados (Aa, Ab, Na e Nb)



Fonte: Leite (2022)

Representação gráfica da separação entre os grupos Aa, Ab, Na e Nb com os componentes principais 1 e 2, que respondem por uma variância total de 69%. A variância explicada pelos componentes é apresentada entre parênteses. Os *clusters* das amostras dos grupos são indicados conforme a legenda e circundados por elipses de IC. As linhas e texto em verde indicam as variáveis selecionadas e a importância das mesmas (escala *eigenvalue*) na variância e separação dos grupos.

Figura 41 - PLS-DA de peptídeos, aminoácidos e derivados nos quatro grupos estudados (Aa, Ab, Na e Nb)



Fonte: Leite (2022)

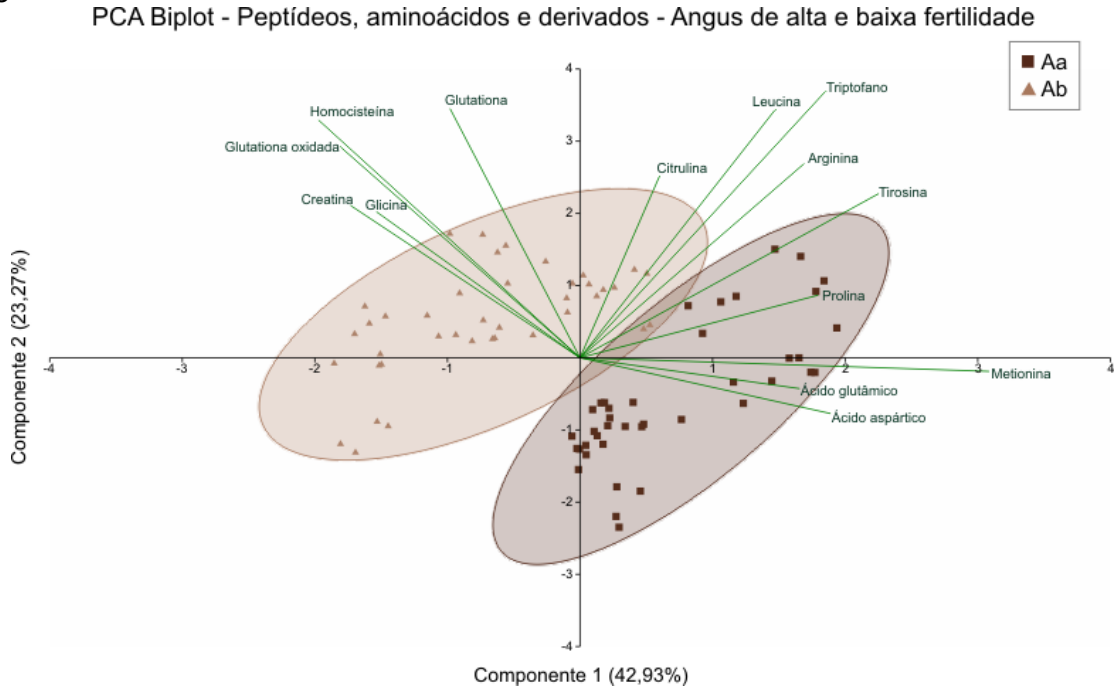
Em A: *score plot* dos componentes selecionados (1 e 3) que respondem por 46,1% da variância; Em B: *VIP score* do componente 1; o *score* dos metabólitos listados à esquerda está relacionado com a



sua contribuição na variância explicada pelo componente; os quadrados em cores apresentados à direita indicam as concentrações relativas dos metabólito em cada grupo analisado.

Apesar dos resultados das análises multivariadas conjunta dos quatro grupos para peptídeos, aminoácidos e derivados mostrar apenas separação entre raças, foram realizadas análises em cada raça para identificar os metabólitos mais importantes entre os grupos de alta e baixa fertilidade. Para a análise entre Angus de alta e baixa fertilidade, foi incluída a homocisteína, metabólito que foi detectado apenas nessa raça. Os dados foram normalizados por log e escala centralizada pela média antes de submetidos às análises. Foram selecionados 14 metabólitos para o modelo de PCA e 18 metabólitos para o de PLS-DA. Em comparação com os resultados observados nas análises com os quatro grupos, houve uma maior separação entre os *clusters* de amostras e elipses de IC nos Angus de alta e baixa fertilidade, principalmente pela influência da homocisteína, aminoácido com o maior VIP score observado. Na PCA, o componente principal 1 foi responsável por 42,9% da variância e o componente principal 2, por 23,3%, com total de 66,2% (Figura 42). Na análise de PLS-DA (validação do modelo com acurácia de 95%,  $R^2=0,816$  e  $Q^2=0,799$ ), os componentes 1 e 3 foram selecionados e responderam por 56,6% da variância (Figura 43A). Os resultados de VIP score (Figura 43B) mostram que, além da homocisteína, glicina, metionina, glutatona oxidada e glutatona foram os metabólitos que mais influenciam a variância, entre os grupos. A influência dos mesmos também pode ser observada no gráfico de PCA *bitplot* (Figura 42), onde os metabólitos citados acima, com a exceção da metionina, possuem maior efeito sobre o grupo de baixa fertilidade.

Figura 42 - PCA em apresentação *biplot* de peptídeos, aminoácidos e derivados nos grupos Angus de alta e baixa fertilidade

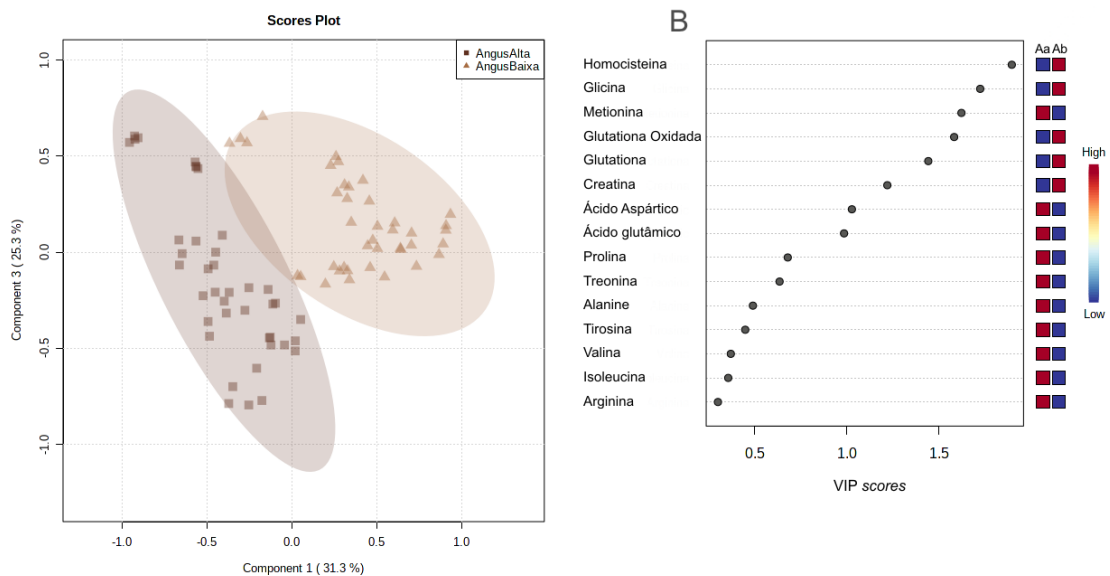


Fonte: Leite (2022)

Representação gráfica da separação entre os grupos Aa e Ab com os componentes principais 1 e 2, que respondem por uma variância total de 66,2%. A variância explicada pelos componentes é apresentada entre parênteses. Os *clusters* das amostras dos grupos são indicados conforme a legenda e circundados por elipses de IC. As linhas e texto em verde indicam as variáveis selecionadas e a importância das mesmas (escala *eigenvalue*) na variância e separação dos grupos.

Figura 43 - PLS-DA de peptídeos, aminoácidos e derivados nos grupos Angus de alta e baixa fertilidade

PLS-DA - Peptídeos, Aminoácidos e Derivados - Angus de Alta e Baixa Fertilidade



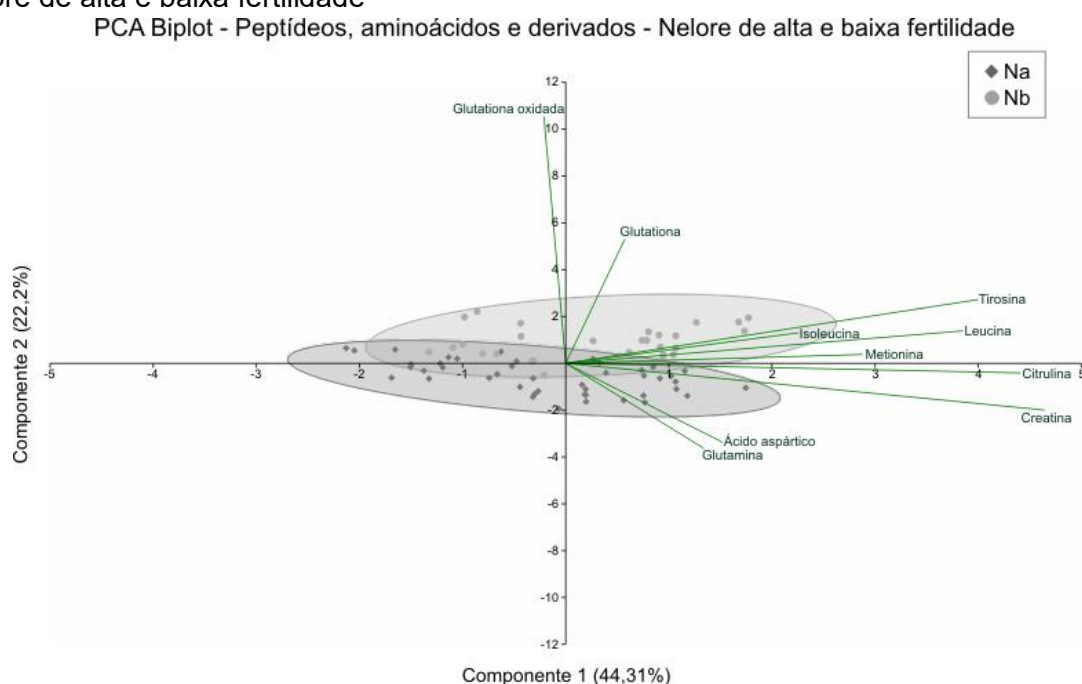
Fonte: Leite (2022)

Em A: *score plot* dos componentes selecionados (1 e 3), que respondem por 56,6% da variância; Em B: *VIP score* do componente 1; o *score* dos metabólitos listados à esquerda está relacionado com a

sua contribuição na variância explicada pelo componente; os quadrados em cores apresentados à direita indicam as concentrações relativas dos metabólitos em cada grupo analisado.

Nas análises entre grupos Nelore de alta e baixa fertilidade os dados foram normalizados por raiz quadrada e escala automática. Para os modelos de PCA e PLS-DA foram selecionados 10 e 15 metabólitos, respectivamente. A seleção dos metabólitos com maiores valores de *loading* permitiu uma separação um pouco maior dos *clusters* de amostras e das elipses de IC, mas ainda assim não foi observada separação clara entre os grupos. Nos resultados de PCA, o componente principal 1 foi responsável por 44,3% da variância e o componente principal 2, por 22,2%, com total de 66,5% (Figura 44). Na análise de PLS-DA (acurácia de 99%,  $R^2=0,91$  e  $Q^2=0,888$ ) os componentes 1 e 2 respondem por 53,9% da variância (Figura 45A). Os resultados de *VIP score* (Figura 45B) apontam a glutatona, glutatona oxidada, glutamina e ácido aspártico como os metabólitos que mais influenciam a variância. No gráfico *biplot*, pode-se observar que os dois primeiros possuem influência sobre o grupo de baixa fertilidade, enquanto glutamina e ácido aspártico possuem mais peso sobre as amostras do grupo de alta fertilidade (Figura 44).

Figura 44 - PCA em apresentação *biplot* de peptídeos, aminoácidos e derivados nos grupos Nelore de alta e baixa fertilidade

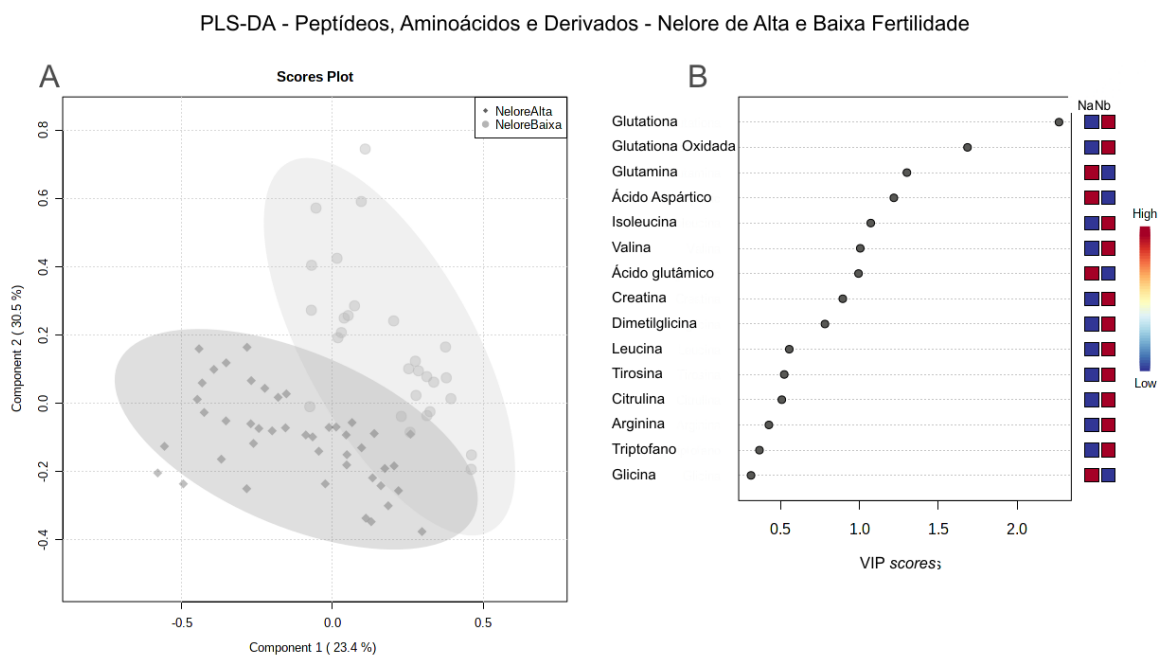


Fonte: Leite (2022)

Representação gráfica da separação entre os grupos Na e Nb com os componentes principais 1 e 2, que respondem por uma variância total de 66,5%. A variância explicada pelos componentes é apresentada entre parênteses. Os *clusters* das amostras dos grupos são indicados conforme a

legenda e circundados por elipses de IC. As linhas e texto em verde indicam as variáveis selecionadas e a importância das mesmas (escala *eigenvalue*) na variância e separação dos grupos.

Figura 45 - PLS-DA de peptídeos, aminoácidos e derivados nos grupos Nelore de alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

Em A: *score plot* dos componentes selecionados (1 e 2), que respondem por 53,9% da variância; Em B: *VIP score* do componente 1; o *score* dos metabólitos listados à esquerda está relacionado com a sua contribuição na variância explicada pelo componente; os quadrados em cores apresentados à direita indicam as concentrações relativas dos metabólito em cada grupo analisado.

### 3.4.2.4 Ácidos Orgânicos

Os ácidos orgânicos possuem funções essenciais em vários processos celulares, atuando no metabolismo energético (ciclo do ácido cítrico e glicólise), como antioxidantes, compostos intermediários em vias de síntese e metabolismo de outras moléculas e em processos de sinalização celular. Ácidos orgânicos detectados com PID próprio foram normalizados pela área e concentração do mesmo, e seus dados convertidos em concentração em ng/mL. Ácidos orgânicos detectados sem PID foram normalizados pela área do pico do ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico (2NMES) detectado em cada amostra, e seus dados são apresentados em *area ratio*. Os resultados da classe de ácidos orgânicos abrangem as diferenças entre os grupos estudados (Aa, Ab, Na e Nb) obtidas pela análise fatorial, de variáveis com e sem interação, e as análises multivariadas de PCA e PLSA, os quais são apresentados em dois tópicos distintos.

### 3.4.2.4.1 Resultados de interação e diferenças entre os grupos

Entre os dez ácidos orgânicos detectados, foi possível observar interação em cinco deles (Tabela 21) de fertilidade (alta vs baixa) e raça (Angus vs Nelore) e foram observadas diferenças entre os grupos, tanto no efeito da raça sobre a fertilidade (Tabela 22) quanto da fertilidade sobre a raça (Tabela 23). Os resultados de ácidos orgânicos sem interação foram divididos em efeito fertilidade (Tabela 24) e efeito raça (Tabela 25).

Tabela 21 - Resultados da análise de interação de fertilidade (alta vs baixa) e raça (Angus vs Nelore) de ácidos orgânicos analisados em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado

ÁCIDOS ORGÂNICOS COM PID (concentração em ng/mL)	Valores de P		
	Raça	Fertilidade	Raça*Fertilidade
Ácido $\alpha$ -cetoglutárico	<,0001	<,0001	<,0001
Ácido Láctico	<,0001	<,0001	0,1663
Ácido Málico	<,0001	0,0075	0,1624
Ácido Pirúvico	<,0001	<,0001	0,0566
Ácido Succínico	0,0001	0,0111	0,1152
ÁCIDOS ORGÂNICOS SEM PID (area ratio)	Raça	Fertilidade	Raça*Fertilidade
Ácido Adenilsuccínico	0,013	<,0001	0,5001
Ácido $\gamma$ -aminobutírico	<,0001	<,0001	0,0002
Ácido Cítrico	0,6669	<,0001	0,0224
Ácido Isocítrico	<,0001	<,0001	0,0141
Acido Pantotênico	0,3690	<,0001	0,6872

Fonte: Leite (2022)

Ácidos orgânicos detectados com PID foram normalizados pelos mesmos e seus dados convertidos em concentração em ng/mL. Ácidos orgânicos detectados sem PID foram normalizados com 2NMES (Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico) e seus dados estão em *area ratio*. Valores de  $P < 0,1$  foram considerados como interação entre os fatores e são apresentados em vermelho.

Tabela 22 - Efeito do grupo genético (Angus e Nelore) na fertilidade (alta e baixa) de ácidos orgânicos analisados em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado

ÂCIDOS ORGÂNICOS COM PID (concentração em ng/mL)	ALTA FERTILIDADE		<i>P</i>	BAIXA FERTILIDADE		<i>P</i>
	ANGUS ( <i>n</i> =40)	NELORE ( <i>n</i> =44)		ANGUS ( <i>n</i> =40)	NELORE ( <i>n</i> =28)	
	Média±SEM	Média±SEM		Média±SEM	Média±SEM	
Ácido α-cetoglutárico	194,18±5,73	353,51±12,89	<,0001	295,34±7,04	389,93±15,57	<,0001
Ácido Pirúvico	84,13±5,25	123,81±7,14	<,0001	102,65±6,16	192,79±11,89	<,0001
ÂCIDOS ORGÂNICOS SEM PID ( <i>area ratio</i> )	Média±SEM	Média±SEM	<i>P</i>	Média±SEM	Média±SEM	<i>P</i>
Ácido γ-aminobutírico	34,21±1,51	21,15±1,08	<,0001	17,61±1,20	15,55±0,91	0,3224
Ácido Cítrico	2101,92±91,93	1828,88±74,96	0,0229	1290,67±84,33	1498,87±53,85	0,0639
Ácido Isocítrico	10,90±0,60	14,89±0,72	0,0001	6,86±0,77	12,50±1,04	<,0001

Fonte: Leite (2022)

Ácidos orgânicos detectados com PID foram normalizados pelos mesmos e seus dados convertidos em concentração em ng/mL. Ácidos orgânicos detectados sem PID foram normalizados com 2NMES (Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico) e seus dados estão em *area ratio*. Resultados em média ± SEM e valor de *P*. Valores de *P*<0,05, são apresentados em vermelho. Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

Tabela 23 - Efeito da fertilidade (alta e baixa) no grupo genético (Angus e Nelore) de ácidos orgânicos analisados em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado

ÂCIDOS ORGÂNICOS COM PID (concentração em ng/mL)	ANGUS		<i>P</i>	NELORE		<i>P</i>
	ALTA FERTILIDADE ( <i>n</i> =40)	BAIXA FERTILIDADE ( <i>n</i> =40)		ALTA FERTILIDADE ( <i>n</i> =44)	BAIXA FERTILIDADE ( <i>n</i> =28)	
	Média±SEM	Média±SEM		Média±SEM	Média±SEM	
Ácido α-cetoglutárico	194,18±5,73	295,34±7,04	<,0001	353,51±12,89	389,93±15,57	0,0663
Ácido Pirúvico	84,13±5,25	102,65±6,16	0,0192	123,81±7,14	192,79±11,89	<,0001
ÂCIDOS ORGÂNICOS SEM PID ( <i>area ratio</i> )	Média±SEM	Média±SEM	<i>P</i>	Média±SEM	Média±SEM	<i>P</i>
Ácido γ-aminobutírico	34,21±1,51	17,61±1,20	<,0001	21,15±1,08	15,55±0,91	<,0001
Ácido Cítrico	2101,92±91,93	1290,67±84,33	<,0001	1828,88±74,96	1498,87±53,85	0,0021
Ácido Isocítrico	10,90±0,60	6,86±0,77	<,0001	14,89±0,72	12,50±1,04	0,0451

Fonte: Leite (2022)

Ácidos orgânicos detectados com PID foram normalizados pelos mesmos e seus dados convertidos em concentração em ng/mL. Ácidos orgânicos detectados sem PID foram normalizados com 2NMES (Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico) e seus dados estão em *area ratio*. Resultados em média ± SEM e valor de *P*. Valores de *P*<0,05, são apresentados em vermelho. Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

Tabela 24 - Efeito fertilidade (alta e baixa) de ácidos orgânicos analisados em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado

ÁCIDOS ORGÂNICOS COM PID (concentração em ng/mL)	ALTA FERTILIDADE (n=84)	BAIXA FERTILIDADE (n=68)	P
	Média±SEM	Média±SEM	
Ácido Láctico	9993,68±358,86	12273,12±445,14	<,0001
Ácido Málico	35,75±1,53	39,25±1,29	0,0075
Ácido Succínico	222,90±5,04	198,00±6,80	0,0111
ÁCIDOS ORGÂNICOS SEM PID (area ratio)	Média±SEM	Média±SEM	P
Ácido Adenilsuccínico	0,85±0,05	0,50±0,03	<,0001
Acido Pantotênico	12,75±0,47	17,56±0,76	<,0001

Fonte: Leite (2022)

Ácidos orgânicos detectados com PID foram normalizados pelos mesmos e seus dados convertidos em concentração em ng/mL. Ácidos orgânicos detectados sem PID foram normalizados com 2NMES (Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico) e seus dados estão em *area ratio*. Resultados em média ± SEM e valor de *P*. Valores de  $P < 0,05$ , são apresentados em vermelho. Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

Tabela 25 - Efeito raça (Angus e Nelore) de ácidos orgânicos analisados em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado

ÁCIDOS ORGÂNICOS COM PI (concentração em ng/mL)	ANGUS (n=80)	NELORE (n=72)	P
	Média±SEM	Média±SEM	
Ácido Láctico	9656,75±359,06	12520,86±412,59	<,0001
Ácido Málico	31,83±1,26	42,46±1,39	<,0001
Ácido Succínico	196,50±6,34	228,73±4,81	0,0001
ÁCIDOS ORGÂNICOS SEM PI (area ratio)	Média±SEM	Média±SEM	P
Ácido Adenilsuccínico	0,61±0,03	0,78±0,06	0,013
Acido Pantotênico	15,53±0,68	14,32±0,65	0,3690

Fonte: Leite (2022)

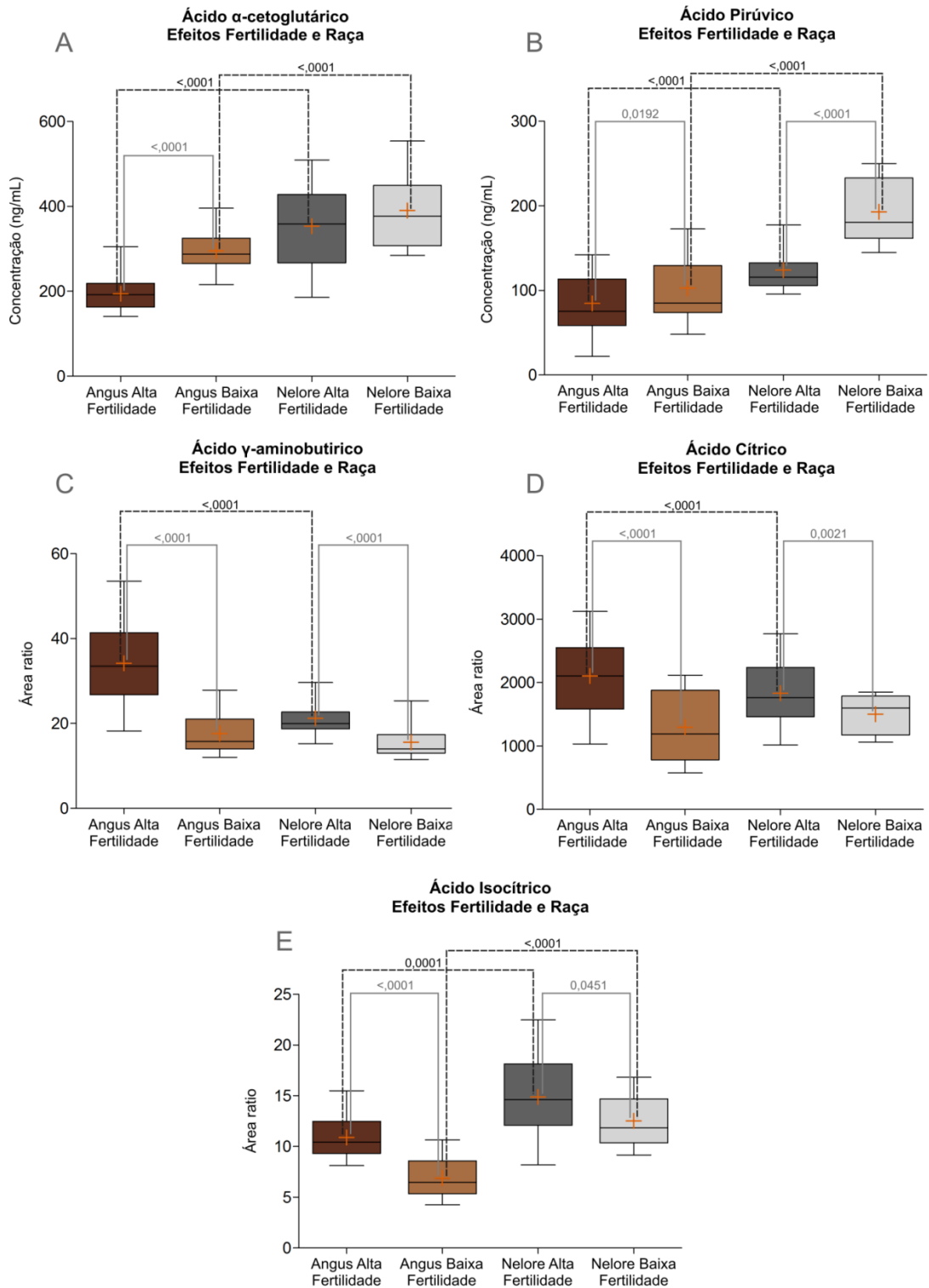
Ácidos orgânicos detectados com PID foram normalizados pelos mesmos e seus dados convertidos em concentração em ng/mL. Ácidos orgânicos detectados sem PID foram normalizados com 2NMES (Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico) e seus dados estão em *area ratio*. Resultados em média ± SEM e valor de *P*. Valores de  $P < 0,05$ , são apresentados em vermelho. Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

Entre os ácidos orgânicos que apresentaram interação, os ácidos  $\alpha$ -cetoglutarico (cetoglutarato) e pirúvico (piruvato), ambos com papel no metabolismo energético celular, atuando no ciclo do ácido cítrico (CAC), foram identificados em maior concentração nos grupos da raça Nelore, tanto em comparação com o grupo Angus de alta quanto com o Angus de baixa fertilidade (Tabela 22 e Figuras 46A e 46B). No primeiro, também foi observado, na raça Angus, maior concentração no grupo de baixa fertilidade em relação ao de alta fertilidade (Tabela 23 e Figura 46A).

Quanto ao ácido pirúvico, houve uma maior concentração nos grupos de baixa fertilidade, Angus e Nelore, em comparação com os respectivos grupos de alta fertilidade (Tabela 23 e Figura 46B). No entanto, o oposto foi observado nos resultados dos ácidos  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), cítrico (citrato) e isocítrico (isocitrato), nos quais os grupos de alta fertilidade das raças Angus e Nelore apresentaram maior *area ratio* em comparação com os grupos correspondentes de baixa fertilidade (Tabela 23 e Figuras 46C, D e E). Para o ácido  $\gamma$ -aminobutírico, importante molécula de sinalização, e para o ácido cítrico, formado no CAC, também houve maior *area ratio* no grupo Aa em relação ao grupo Na (Tabela 22 e Figuras 46C e D). Já para o ácido isocítrico, produto intermediário no CAC, houve maior *area ratio* nos animais da raça Nelore, de alta e baixa fertilidade, em relação aos respectivos grupos da raça Angus (Tabela 22 e Figura 46E).



Figura 46 - Gráficos dos resultados das análises de ácidos orgânicos que apresentaram interação fertilidade\*raça nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade

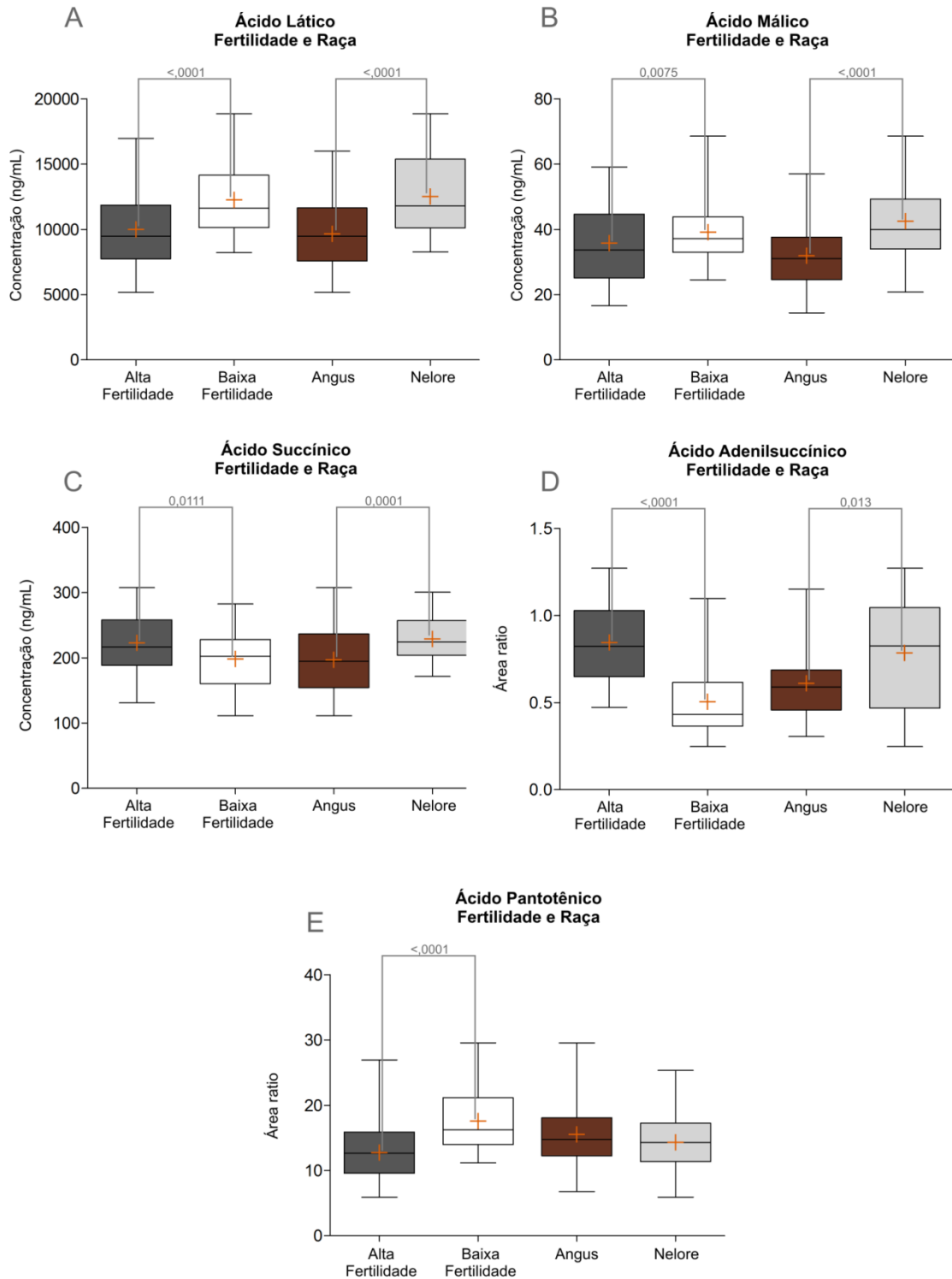


Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartis, limites mínimo e máximo (*whiskers*) e média (+ em laranja); diferenças entre os grupos são marcadas por linhas com o valor de *P* sobre as mesmas. Em A: ácido  $\alpha$ -cetoglutárico; Em B: ácido pirúvico; Em C: ácido  $\gamma$ -aminobutírico; Em D: ácido cítrico; Em E: ácido isocítrico.

Nos ácidos orgânicos sem interação, os animais de baixa fertilidade apresentaram maior quantidade dos ácidos láctico (lactato) e málico (malato) (Tabela 24 e Figuras 47A e B), ambos com papel importante no metabolismo energético. O mesmo foi observado para o ácido pantotênico, metabólito essencial em várias vias metabólicas e com propriedades antioxidantes (Tabela 24 e Figura 47E). Na comparação do efeito raça, houve maior concentração dos ácidos láctico e málico na raça Nelore em comparação com a Angus (Tabela 25 e Figuras 47A e B). Os ácidos succínico e adenilsuccínico, ambos com ação no metabolismo energético, entre outras funções, também foram detectados em maior quantidade na raça Nelore (Tabela 25 e Figuras 47C e D). No entanto, para o efeito fertilidade, o grupo de alta fertilidade apresentou maior concentração e *area ratio* dos mesmos em relação ao de baixa fertilidade (Tabela 24 e Figuras 47C e D).

Figura 47 - Gráficos dos resultados das análises de ácidos orgânicos que apresentaram apenas efeitos fertilidade e raça nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade



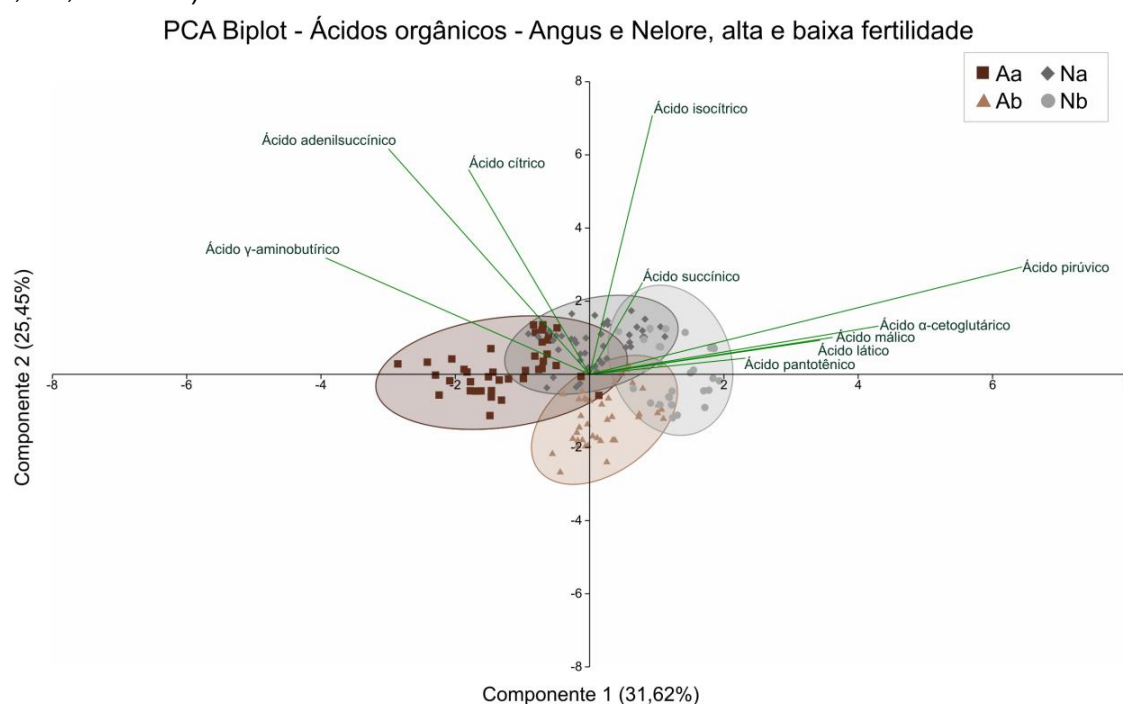
Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartil, limites mínimo e máximo (*whiskers*) e média (+ em laranja); diferenças entre os grupos são marcadas por linhas com o valor de *P* sobre as mesmas. Em A: ácido láctico; Em B: ácido málico; Em C: ácido succínico; Em D: ácido adenilsuccínico; Em E: ácido pantotênico.

### 3.4.2.4.2 Resultados de PCA e PLS-DA

Os dez ácidos orgânicos detectados foram utilizados para as análises multivariadas de PCA e PLS-DA nos quatro grupos estudados (Aa, Ab, Na e Nb). Os dados foram normalizados com transformação por log e escala automática (centralizada pela média e dividida pelo desvio padrão de cada variável). Nos resultados de PCA, o componente principal 1 foi responsável por 31,6% da variância e o componente principal 2, por 25,5% (Figura 48), somando 57,1%. Na PLS-DA, a soma dos componentes utilizados (1 e 4) respondeu por apenas 47,3% da variância (Figura 49A). O modelo utilizado teve acurácia de 82% e índices de construção e predição bons ( $R^2=0,807$  e  $Q^2= 0,788$ ). Nas duas análises, apesar de baixa resposta pela variância e pouca separação entre os quatro grupos, houve uma separação maior entre os *clusters* das amostras dos grupos Angus de alta e baixa fertilidade. Quanto ao VIP score, os ácidos  $\alpha$ -cetoglutárico, pirúvico e  $\gamma$ -aminobutírico (Figura 49B) possuem os maiores valores. A importância do ácido  $\gamma$ -aminobutírico sobre o grupo Angus de alta fertilidade e dos ácidos pirúvico e  $\alpha$ -cetoglutárico sobre o grupo Nelore de baixa fertilidade, bem como das demais variáveis pode ser observada no gráfico *biplot* (Figura 48).

Figura 48 - PCA em apresentação *biplot* de ácidos orgânicos nos quatro grupos estudados (Aa, Ab, Na e Nb)

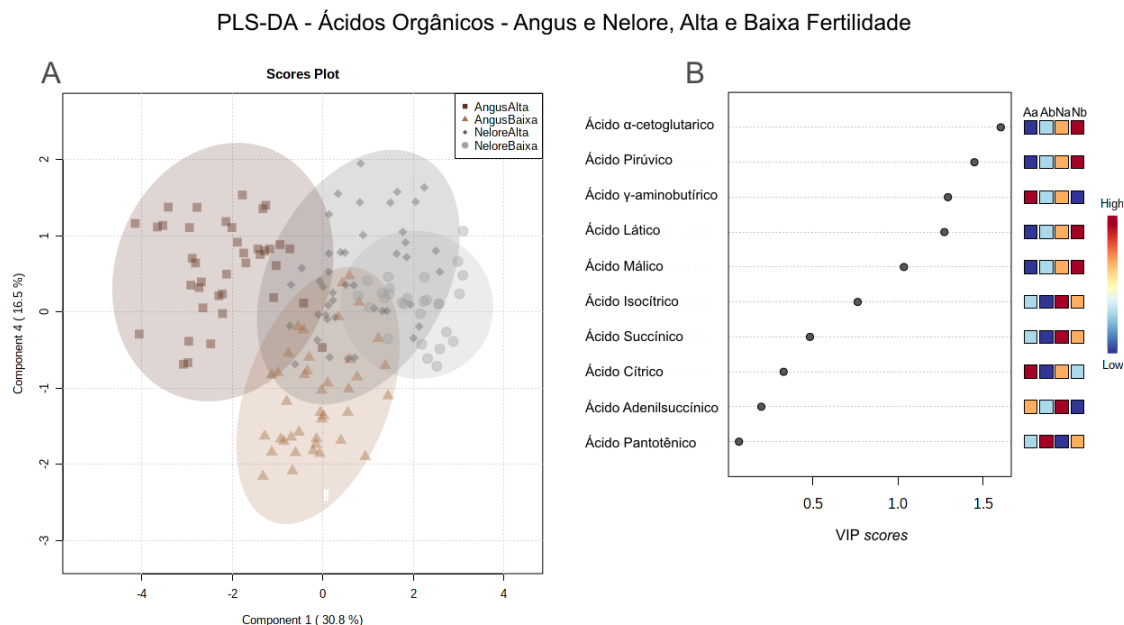


Fonte: Leite (2022)

Representação gráfica da separação entre os grupos Aa, Ab, Na e Nb com os componentes principais 1 e 2, que respondem por uma variância total de 57,1%. A variância explicada pelos

componentes é apresentada entre parênteses. Os *clusters* das amostras dos grupos são indicados conforme a legenda e circundados por elipses de IC. As linhas e texto em verde indicam as variáveis selecionadas e a importância das mesmas (escala *eigenvalue*) na variância e separação dos grupos.

Figura 49 - PLS-DA de ácidos orgânicos nos quatro grupos estudados (Aa, Ab, Na e Nb)

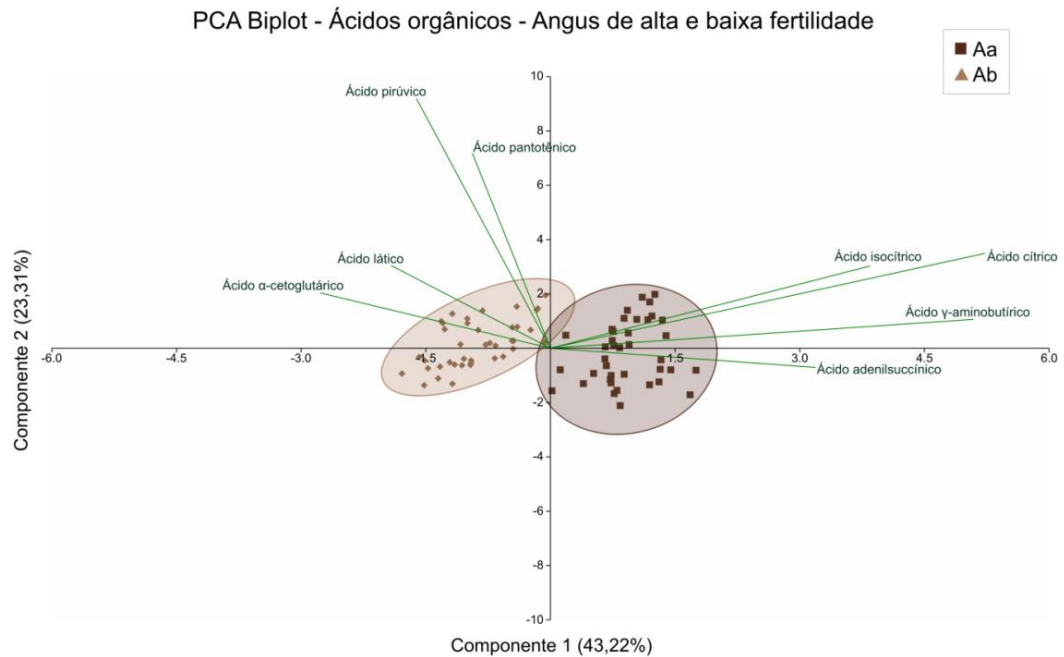


Fonte: Leite (2022)

Em A: *score plot* dos componentes selecionados (1 e 4), que respondem por 47,3% da variância; Em B: *VIP score* do componente 1; o *score* dos metabólitos listados à esquerda está relacionado com a sua contribuição na variância explicada pelo componente; os quadrados em cores apresentados à direita indicam as concentrações relativas dos metabólito em cada grupo analisado.

Na análise de PCA para as amostras dos grupos Angus de alta e baixa fertilidade, oito metabólitos foram selecionados para o modelo, com os dados normalizados por log e escala centralizada pela média. Houve um aumento na resposta da variância e maior separação entre os *clusters* de amostras e pequena sobreposição das elipses de IC, em comparação com a análise com os quatro grupos. O componente principal 1 foi responsável por 43,2% da variância e o componente principal 2, por 23,3%, com total de 66,5% (Figura 50). Para a PLS-DA, foram utilizados 10 metabólitos para o modelo (validação com acurácia de 99%,  $R^2=0,876$  e  $Q^2=0,854$ ) e, por ser um método de classificação supervisionado, a separação entre os grupos foi maior. Os dois componentes selecionados respondem por 54,3% da variância (Figura 51A). Os resultados de *VIP score* (Figura 51B) mostram os ácidos  $\gamma$ -aminobutírico, cítrico e isocítrico como os metabólitos que mais influenciam a variância entre os grupos. O mesmo foi observado no gráfico de PCA *biplot*, onde se nota a influência destes ácidos sobre o grupo de alta fertilidade (Figura 50).

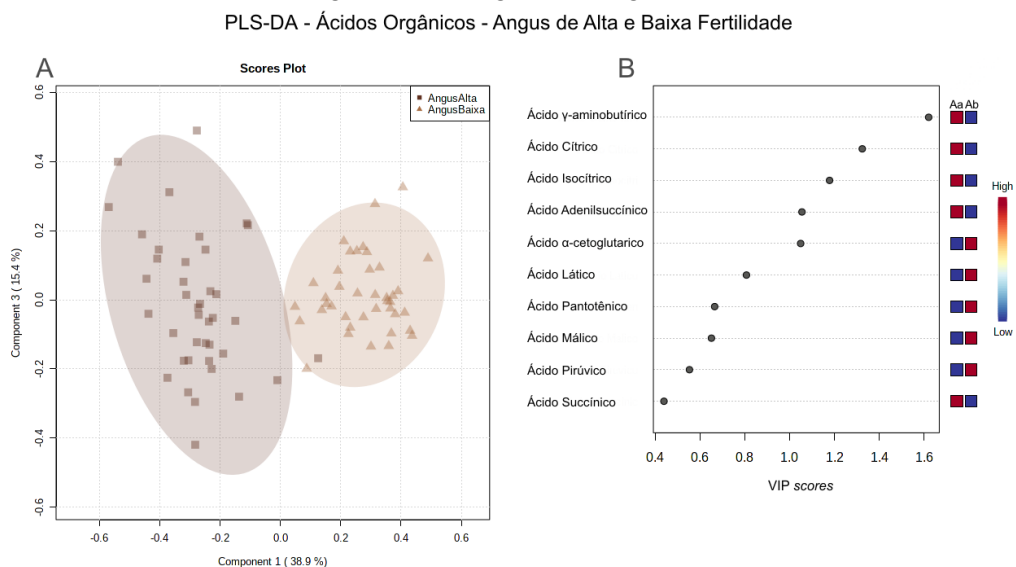
Figura 50 - PCA em apresentação *biplot* de ácidos orgânicos nos grupos Angus de alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

Representação gráfica da separação entre os grupos Aa e Ab com os componentes principais 1 e 2, que respondem por uma variância total de 66,5%. A variância explicada pelos componentes é apresentada entre parênteses. Os *clusters* das amostras dos grupos são indicados conforme a legenda e circundados por elipses de IC. As linhas e texto em verde indicam as variáveis selecionadas e a importância das mesmas (escala *eigenvalue*) na variância e separação dos grupos.

Figura 51 - PLS-DA de ácidos orgânicos nos grupos Angus de alta e baixa fertilidade

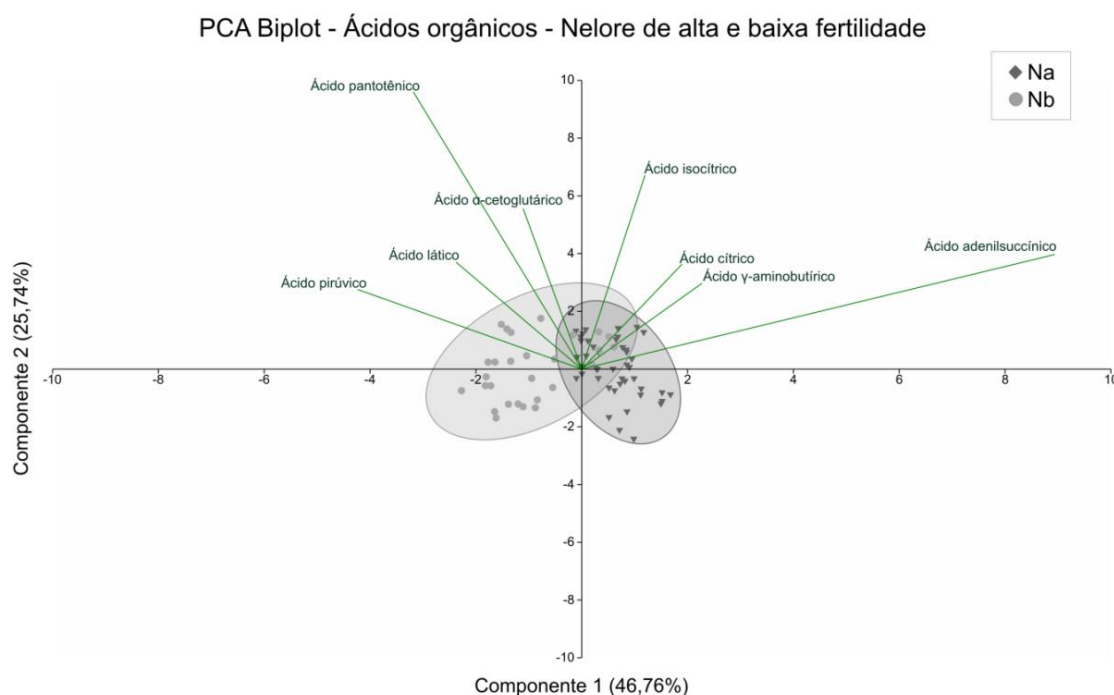


Fonte: Leite (2022)

Em A: *score plot* dos componentes selecionados (1 e 3) que respondem por 54,3% da variância; Em B: *VIP score* do componente 1; o *score* dos metabólitos listados à esquerda está relacionado com a sua contribuição na variância explicada pelo componente; os quadrados em cores apresentados à direita indicam as concentrações relativas dos metabólito em cada grupo analisado.

Para as análises multivariadas entre os grupos da raça Nelore, os dados foram normalizados por log e centralização pela média. Com a análise prévia de correlação e *fold change*, foram selecionados oito ácidos orgânicos para o modelo usado, com exclusão os ácidos málico e succínico. Na PCA, o componente principal 1 foi responsável por 46,8% da variância e o componente principal 2, por 25,7%, com total de 72,5% (Figura 52). Apesar de boa explicação da variância, verificou-se que a separação entre os grupos foi parcial, com sobreposição de parte das amostras. Na PLS-DA (acurácia de 99%,  $R^2=0,783$  e  $Q^2=0,749$ ) houve maior separação entre grupos, no entanto, os componentes utilizados (1 e 4) responderam por uma variância mais baixa, de 66,3% (Figura 53A). Os resultados de *VIP score* mostram que os ácidos adenilsuccínico e pirúvico possuem maior influência sobre a variância (Figura 53B). O mesmo pode ser observado no gráfico de PCA *biplot* com o ácido adenilsuccínico com maior influência sobre o grupo Nelore de alta fertilidade e os ácidos pirúvico e pantotênico, sobre o de baixa fertilidade (Figura 52).

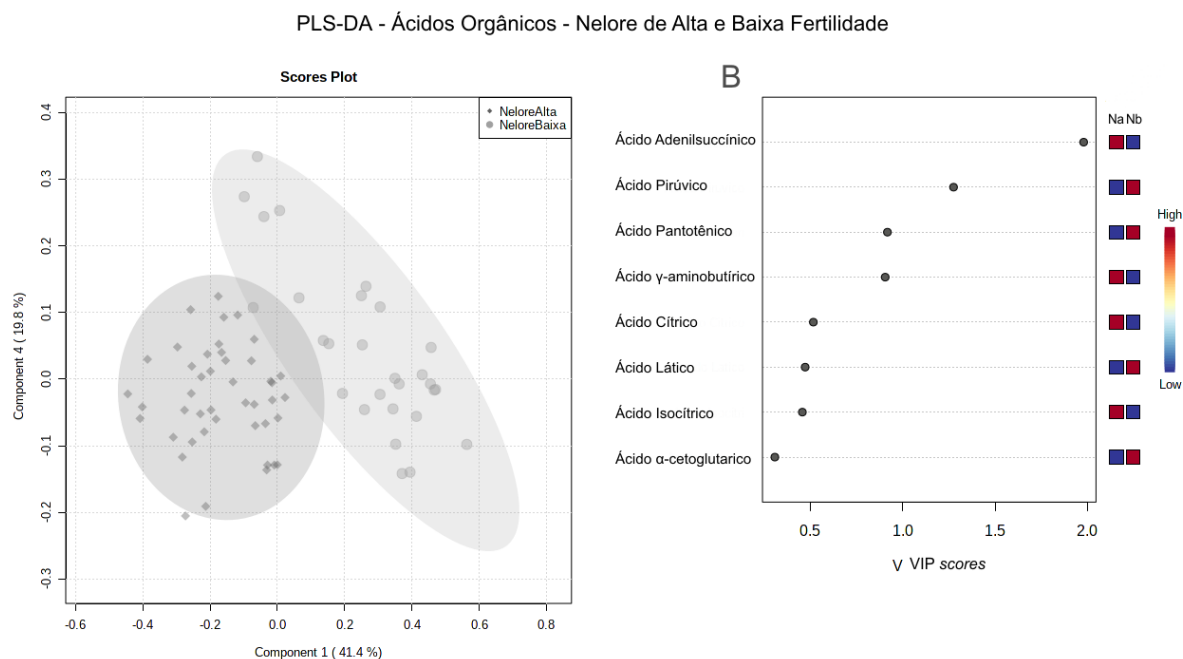
Figura 52 - PCA em apresentação *biplot* de ácidos orgânicos nos grupos Nelore de alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

Representação gráfica da separação entre os grupos Na e Nb com os componentes principais 1 e 2, que respondem por uma variância total de 72,5%. A variância explicada pelos componentes é apresentada entre parênteses. Os *clusters* das amostras dos grupos são indicados conforme a legenda e circundados por elipses de IC. As linhas e texto em verde indicam as variáveis selecionadas e a importância das mesmas (escala *eigenvalue*) na variância e separação dos grupos.

Figura 53 - PLS-DA de ácidos orgânicos nos grupos Nelore de alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

Em A: *score plot* dos componentes selecionados (1 e 4), que respondem por 66,3% da variância; Em B: VIP score do componente 1; o *score* dos metabólitos listados à esquerda está relacionado com a sua contribuição na variância explicada pelo componente; os quadrados em cores apresentados à direita indicam as concentrações relativas dos metabólito em cada grupo analisado.

### 3.4.2.5 Nucleobases, nucleosídeos, nucleotídeos e demais metabólitos

Os demais metabólitos detectados nos métodos *target* incluem nucleobases, nucleosídeos e nucleotídeos, blocos essenciais na formação de ácidos nucleicos, além de desempenharem papel fundamental no metabolismo energético. Foram detectados ainda derivados purínicos e precursores importantes de componentes do metabolismo celular. Metabólitos detectados com PID próprio, foram normalizados pela área e concentração do mesmo, e seus dados convertidos em concentração em ng/mL. Metabólitos detectados sem PID próprio foram normalizados pela área do pico do ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico (2NMES), detectado em cada amostra, com seus dados apresentados em *area ratio*. Os resultados abaixo abrangem as diferenças entre os grupos estudados (Aa, Ab, Na e Nb) obtidas pela análise fatorial, de variáveis com e sem interação, e análises multivariadas de PCA e PLSA, os quais são apresentados em dois tópicos distintos.



### 3.4.2.5.1 Resultados de interação e diferenças entre os grupos

Entre os 16 metabólitos detectados foi possível observar interação de fertilidade (alta vs baixa) e raça (Angus vs Nelore) em apenas quatro deles (Tabela 26). Foram observadas diferenças entre os grupos, tanto no efeito da raça sobre a fertilidade (Tabela 27) quanto da fertilidade sobre a raça (Tabela 28). Os resultados de metabólitos que apresentaram diferença sem interação foram divididos em efeito fertilidade (Tabela 29) e efeito raça (Tabela 30).

Tabela 26 - Resultados da análise de interação de fertilidade (Alta vs Baixa) e raça (Angus vs Nelore) de metabólitos analisados (com e sem padrão) em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado

CLASSE	METABÓLITO COM PID Concentração (ng/mL)	Valores de P		
		Raça	Fertilidade	Raça*Fertilidade
nucleobase (purina)	Adenina	0,2885	<,0001	0,0159
nucleosídeo (purina)	Adenosina	0,0624	<,0001	0,0007
nucleosídeo (purina)	Guanosina	0,6516	0,0027	0,1821
CLASSE	METABÓLITO SEM PID ( <i>area ratio</i> )	Raça	Fertilidade	Raça*Fertilidade
base purínica	Xantina	<,0001	<,0001	0,2757
derivado purínico	Hipoxantina	<,0001	<,0001	0,4485
derivado purínico	Ácido úrico	0,1127	0,8481	0,3035
nucleosídeo (purina)	Inosina	0,0031	0,0006	0,7091
nucleosídeo (pirimidina)	Uridina	0,0001	0,9244	0,9756
nucleotídeo (purina)	Monofosfato de Adenosina (AMP)	0,0139	0,0012	0,6389
nucleotídeo (purina)	AMP cíclico	<,0001	<,0001	0,0243
nucleotídeo (pirimidina)	Monofosfato de Citidina (CMP)	<,0001	0,0195	0,8017
nucleotídeo (purina)	Monofosfato de Guanosina (GMP)	0,0385	0,0526	0,7834
nucleotídeo (pirimidina)	Monofosfato de Timidina (TMP)	0,0062	0,3562	0,0282
mononucleotídeo	Mononucleotídeo de Flavina (FMN)	0,0036	0,0004	0,8125
precursor (acetilcolina/PC)	Colina	<,0001	<,0001	0,2580
piridinocarboxamida	Nicotinamida (vitamina B3)	<,0001	<,0001	0,6550

Fonte: Leite (2022)

Metabólitos detectados com PID foram normalizados pelos mesmos e seus dados convertidos em concentração em ng/mL. Metabólitos detectados sem PID foram normalizados com 2NMES (Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico) e seus dados estão em *area ratio*. Valores de P<0,1 foram considerados como interação entre os fatores e são apresentados em vermelho.

Tabela 27 - Efeito do grupo genético (Angus e Nelore) na fertilidade (alta e baixa) de metabólitos analisados em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado

METABÓLITO COM PID Concentração (ng/mL)	ALTA FERTILIDADE		P	BAIXA FERTILIDADE		P
	ANGUS (n=40)	NELORE (n=44)		ANGUS (n=40)	NELORE (n=28)	
	Média±SEM	Média±SEM		Média±SEM	Média±SEM	
Adenina	710.78±27.29	874.12±47.11	0,0068	1067.89±58.89	939.47±38.14	0,3358
Adenosina	2843,18±149,89	3769,33±174,94	0,0001	4497,52±231,07	4076,13±110,75	0,2442
METABÓLITO SEM PID (area ratio)	Média±SEM	Média±SEM	P	Média±SEM	Média±SEM	P
AMP cíclico	2,02±0,10	3,11±0,22	<,0001	3,82±0,21	4,12±0,19	0,1348
Monofosfato de Timidina (TMP)	1,01±0,06	1,05±0,06	0,6828	0,94±0,06	1,24±0,06	0,0009

Fonte: Leite (2022)

Metabólitos detectados com PID foram normalizados pelos mesmos e seus dados convertidos em concentração em ng/mL. Metabólitos detectados sem PID foram normalizados com 2NMES (Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico) e seus dados estão em *area ratio*. Resultados em média ± SEM e valor de *P*. Valores de *P*<0,05, são apresentados em vermelho. Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

Tabela 28 - Efeito da fertilidade (alta e baixa) no grupo genético (Angus e Nelore) de metabólitos analisados em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado

METABÓLITO COM PID Concentração (ng/mL)	ANGUS		P	NELORE		P
	ALTA FERTILIDADE (n=40)	BAIXA FERTILIDADE (n=40)		ALTA FERTILIDADE (n=44)	BAIXA FERTILIDADE (n=28)	
	Média±SEM	Média±SEM		Média±SEM	Média±SEM	
Adenina	710.78±27.29	1067.89±58.89	<,0001	874.12±47.11	939.47±38.14	0,0906
Adenosina	2843,18±149,89	4497,52±231,07	<,0001	3769,33±174,94	4076,13±110,75	0,0748
METABÓLITO SEM PID (area ratio)	Média±SEM	Média±SEM	P	Média±SEM	Média±SEM	P
AMP cíclico	2,02±0,10	3,82±0,21	<,0001	3,11±0,22	4,12±0,19	<,0001
Monofosfato de Timidina (TMP)	1,01±0,06	0,94±0,06	0,3745	1,05±0,06	1,24±0,06	0,0233

Fonte: Leite (2022)

Metabólitos detectados com PID foram normalizados pelos mesmos e seus dados convertidos em concentração em ng/mL. Metabólitos detectados sem PID foram normalizados com 2NMES (Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico) e seus dados estão em *area ratio*. Resultados em média ± SEM e valor de *P*. Valores de *P*<0,05, são apresentados em vermelho. Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

Tabela 29 - Efeito fertilidade (alta e baixa) de metabólitos analisados em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado

METABÓLITO COM PID Concentração (ng/mL)	ALTA FERTILIDADE (n=84)	BAIXA FERTILIDADE (n=68)	P
	Média±SEM	Média±SEM	
Guanosina	297,59±11,76	349,91±15,03	0,0027
METABÓLITO SEM PID (area ratio)	Média±SEM	Média±SEM	P
Xantina	0,43±0,02	0,29±0,01	<,0001
Hipoxantina	4,37±0,14	2,72±0,12	<,0001
Ácido úrico	0,42±0,02	0,43±0,02	0,8481
Inosina	52,86±1,76	67,62±1,51	0,0006
Uridina	2,77±0,11	2,77±0,09	0,9244
Monofosfato de Adenosina (AMP)	189,39±8,75	245,57±10,76	0,0012
Monofosfato de Citidina (CMP)	7,30±0,20	6,58±0,23	0,0195
Monofosfato de Guanosina (GMP)	6,66±0,22	7,03±0,17	0,0526
Mononucleotídeo de Flavina (FMN)	0,27±0,01	0,35±0,02	0,0004
Colina	49,20±2,23	40,27±2,39	<,0001
Nicotinamida (vitamina B3)	9,45±0,38	15,57±0,66	<,0001

Fonte: Leite (2022)

Metabólitos detectados com PID foram normalizados pelos mesmos e seus dados convertidos em concentração em ng/mL. Metabólitos detectados sem PID foram normalizados com 2NMES (Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico) e seus dados estão em *area ratio*. Resultados em média ± SEM e valor de *P*. Valores de  $P < 0,05$ , são apresentados em vermelho. Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

Tabela 30 - Efeito raça (Angus e Nelore) de ácidos orgânicos analisados em células espermáticas de amostras de sêmen criopreservado

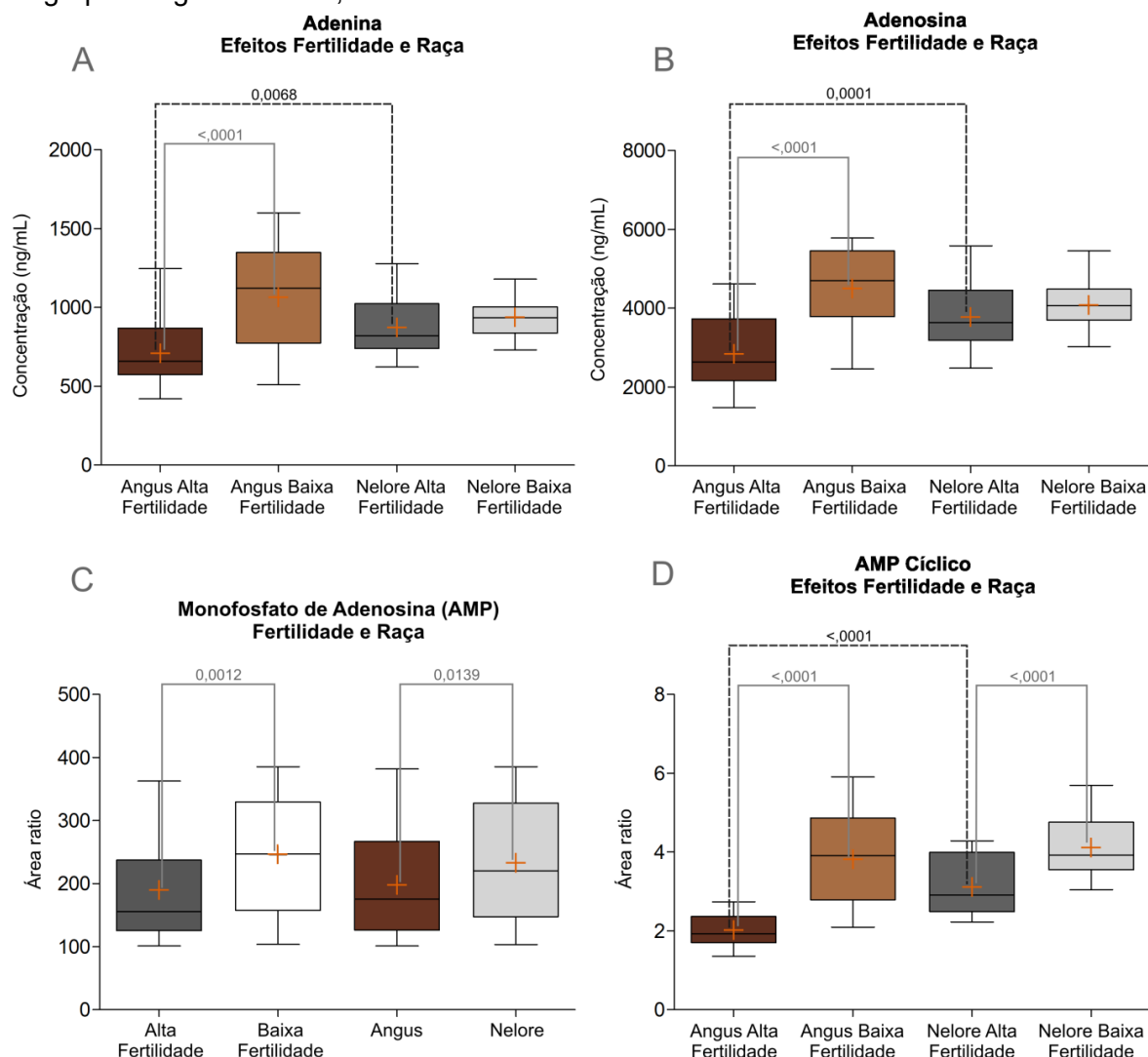
METABÓLITO COM PID Concentração (ng/mL)	ANGUS (n=80)	NELORE (n=72)	P
	Média±SEM	Média±SEM	
Guanosina	326,74±14,58	314,62±12,09	0,6516
METABÓLITO SEM PID (area ratio)	Média±SEM	Média±SEM	P
Xantina	0,41±0,02	0,33±0,02	<,0001
Hipoxantina	4,21±0,17	2,99±0,13	<,0001
Ácido úrico	0,45±0,02	0,41±0,02	0,1127
Inosina	64,73±1,94	53,61±1,43	0,0031
Uridina	3,03±0,11	2,48±0,08	0,0001
Monofosfato de Adenosina (AMP)	197,85±9,44	233,05±10,56	0,0139
Monofosfato de Citidina (CMP)	6,05±0,32	7,98±0,29	<,0001
Monofosfato de Guanosina (GMP)	6,31±0,17	7,39±0,22	0,0385
Mononucleotídeo de Flavina (FMN)	0,33±0,01	0,28±0,01	0,0036
Colina	59,87±1,85	28,91±1,08	<,0001
Nicotinamida (vitamina B3)	15,18±0,64	8,86±0,33	<,0001

Fonte: Leite (2022)

Metabólitos detectados com PID foram normalizados pelos mesmos e seus dados convertidos em concentração em ng/mL. Metabólitos detectados sem PID foram normalizados com 2NMES (Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico) e seus dados estão em *area ratio*. Resultados em média ± SEM e valor de *P*. Valores de  $P < 0,05$ , são apresentados em vermelho. Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

Na classe de nucleobases e derivados detectados, adenina, adenosina, monofosfato de adenosina (AMP) e AMP cíclico, possuem papel fundamental no metabolismo energético celular, especialmente no caso do espermatozoide, cuja movimentação flagelar depende de elevada produção e consumo de trifosfato de adenosina (ATP). Os nucleotídeos de adenina não são apenas fonte de energia, mas também são moléculas de sinalização importantes e atuam em processos regulatórios. Adenina e adenosina tiveram interação e os mesmos resultados, com maior concentração no grupo Nelore de alta fertilidade em relação ao grupo correspondente da raça Angus (Tabela 27 e Figuras 54A e B) e, dentro da raça Angus, maior concentração no grupo de baixa fertilidade, em comparação com o de alta fertilidade (Tabela 28 e Figuras 54A e B). O mesmo resultado foi observado para o AMP cíclico (Tabelas 27 e 28 e Figuras 54A e B), no qual, houve também maior detecção no grupo Nelore de baixa fertilidade em comparação com o de alta fertilidade (Tabela 28 e Figura 54D). Apesar de não haver interação para o AMP, o mesmo padrão foi observado, com maior detecção nos animais de baixa fertilidade em relação aos de alta fertilidade e na raça Nelore em comparação com Angus e (Tabelas 28 e 29 e Figura 54C).

Figura 54 - Gráficos dos resultados das análises de adenina, adenosina AMP e AMP cíclico nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade

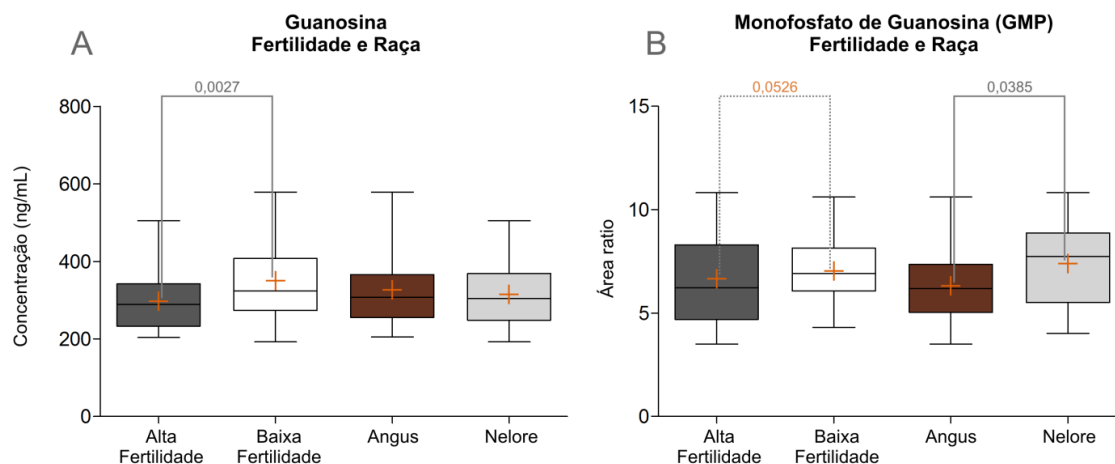


Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartis, limites mínimo e máximo (*whiskers*) e média (+ em laranja); diferenças entre os grupos são marcadas por linhas com o valor de *P* sobre as mesmas. Em A: adenina (interação fertilidade\*raça); Em B: adenosina (interação fertilidade\*raça); Em C: monofosfato de adenosina (efeitos fertilidade e raça); Em D: AMP cíclico (interação fertilidade\*raça).

Guanosina e sua forma fosforilada, monofostato de guanosina (GMP), derivados de guanina, também possuem função na formação de ácidos nucleicos e proteínas, no metabolismo energético e como moléculas de sinalização. Estes dois metabólitos não apresentaram interação, com a guanosina com maior concentração em animais de baixa fertilidade (Tabela 29 e Figura 55A). Houve uma tendência de resultado semelhante no caso do GMP ( $P=0,0526$ ), que apresentou maior detecção em animais da raça Nelore (Tabela 30 e Figura 55B).

Figura 55 - Gráficos dos resultados das análises de guanosina e GMP nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade

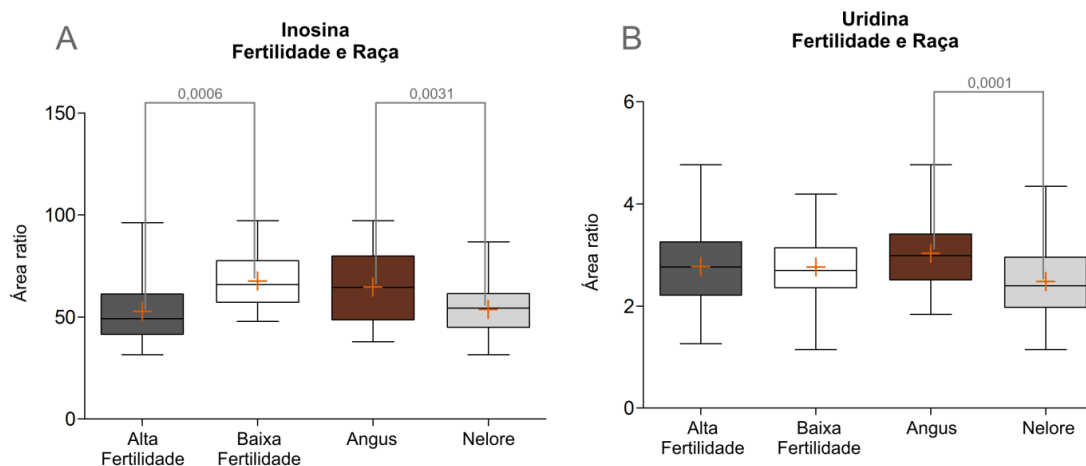


Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartis, limites mínimo e máximo (*whiskers*) e média (+ em laranja); diferenças entre os grupos são marcadas por linhas com o valor de *P* sobre as mesmas. Em A: guanosina (efeitos fertilidade e raça); Em B: monofosfato de guanosina (efeitos fertilidade e raça).

Não houve interação nos resultados dos nucleosídeos inosina e uridina. Para a inosina, nucleosídeo purínico derivado da hipoxantina e metabólito intermediário na degradação de purinas, foi detectada maior presença nos animais de baixa fertilidade (Tabela 29 e Figura 56A), e na raça Angus (Tabela 30 e Figura 56A). Em relação à raça, o mesmo foi observado na uridina, nucleosídeo derivado da uracila, com maior presença em Angus (Tabela 30 e Figura 56B).

Figura 56 - Gráficos dos resultados das análises de inosina e uridina nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade

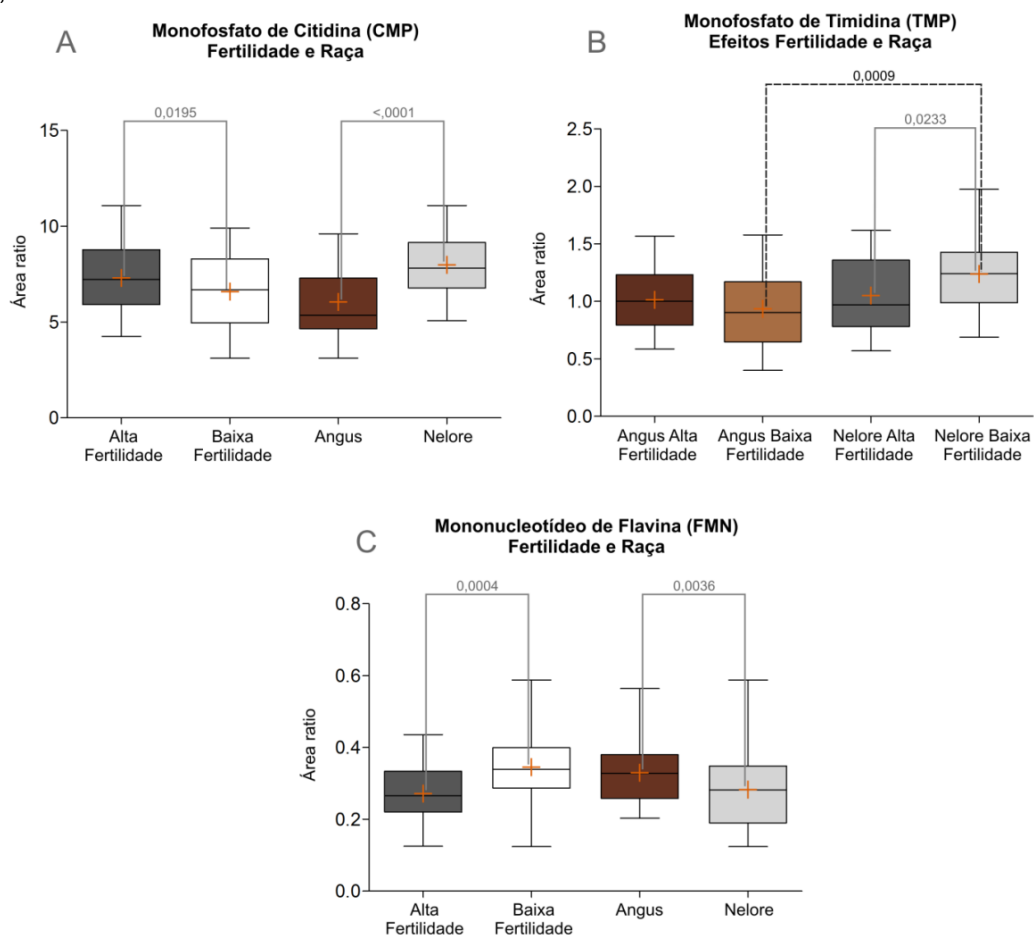


Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartis, limites mínimo e máximo (*whiskers*) e média (+ em laranja); diferenças entre os grupos são marcadas por linhas com o valor de *P* sobre as mesmas. Em A: inosina (efeitos fertilidade e raça); Em B: uridina (efeitos fertilidade e raça).

Para os nucleotídeos restantes, monofosfato de citidina, monofosfato de timidina e mononucleotídeo de flavina, houve interação apenas para o derivado de timidina, que por sua vez é formado a partir da nucleobase timina. Nele houve maior detecção no grupo Nelore de baixa fertilidade, tanto em comparação ao grupo correspondente da raça Angus (Tabela 27 e Figura 57B), quanto em relação ao grupo Nelore de alta fertilidade (Tabela 28 e Figura 57B). Para o monofosfato de citidina, originado pela perda de dois fosfatos pelo trifosfato de citidina (CTP) ou pela aminação do trifosfato de uridina (UTP), houve maior presença no grupo de alta fertilidade (Tabela 29 e Figura 57A) e na raça Nelore (Tabela 30 e Figura 57A). O oposto foi observado para o mononucleotídeo de flavina, componente importante de várias oxidoredutases e associado a reações enzimáticas no metabolismo celular, com maior presença no grupo de baixa fertilidade (Tabela 29 e Figura 57C) e na raça Angus (Tabela 30 e Figura 57C).

Figura 57 - Gráficos dos resultados das análises de CMP, TMP e FMN nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade



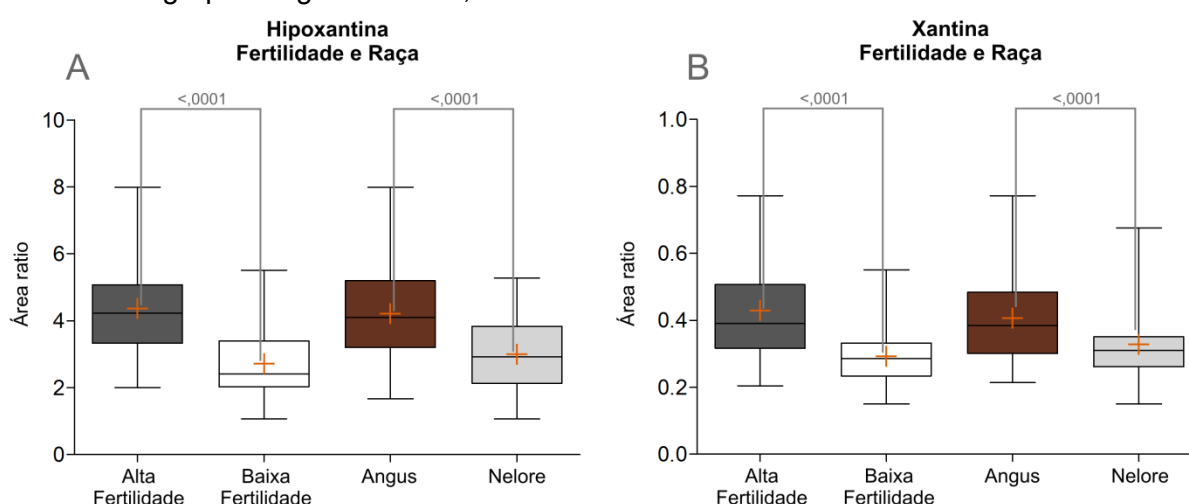
Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartis, limites mínimo e máximo (*whiskers*) e média (+ em laranja); diferenças entre os grupos são marcadas por linhas com o valor de

*P* sobre as mesmas. Em A: monofosfato de citidina (efeitos fertilidade e raça); Em B: monofosfato de timina (interação fertilidade\*raça); Em C: mononucleotídeo de flavina (efeitos fertilidade e raça).

Entre os metabólitos detectados, hipoxantina e xantina, são derivados purínicos e produtos intermediários no processo de oxidação do metabolismo de purinas, cujo produto final é o ácido úrico, para o qual não houve diferença entre os grupos estudados (Tabelas 29 e 30). No entanto, houve maior detecção de hipoxantina e xantina (formada pela oxidação da hipoxantina) nos animais de alta fertilidade e na raça Angus (Tabelas 29 e 30 e Figuras 58A e B).

Figura 58 - Gráficos dos resultados das análises dos derivados purínicos Hipoxantina e Xantina nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade



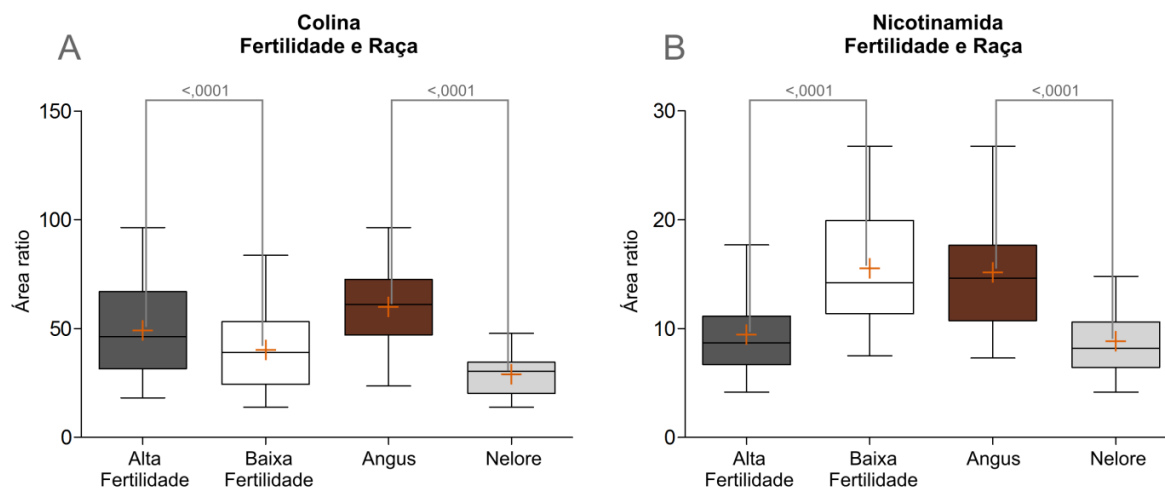
Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartis, limites mínimo e máximo (*whiskers*) e média (+ em laranja); diferenças entre os grupos são marcadas por linhas com o valor de *P* sobre as mesmas. Em A: hipoxantina (efeitos fertilidade e raça); Em B: xantina (efeitos fertilidade e raça).

Importante precursor de componentes celulares essenciais, como fosfolípidios e moléculas de sinalização, a colina foi detectada em maior quantidade no grupo de alta fertilidade (Tabela 29 e Figura 59A) e na raça Angus (Tabela 30 e Figura 59A). Por fim, houve maior detecção de nicotinamida (NAM), metabólito que é parte fundamental da coenzima dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD<sup>+</sup> e NADH), nos animais de baixa fertilidade (Tabela 29 e Figura 59B) e na raça Angus (Tabela 30 e Figura 59B).



Figura 59 - Gráficos dos resultados das análises de Colina e Nicotinamida nos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade



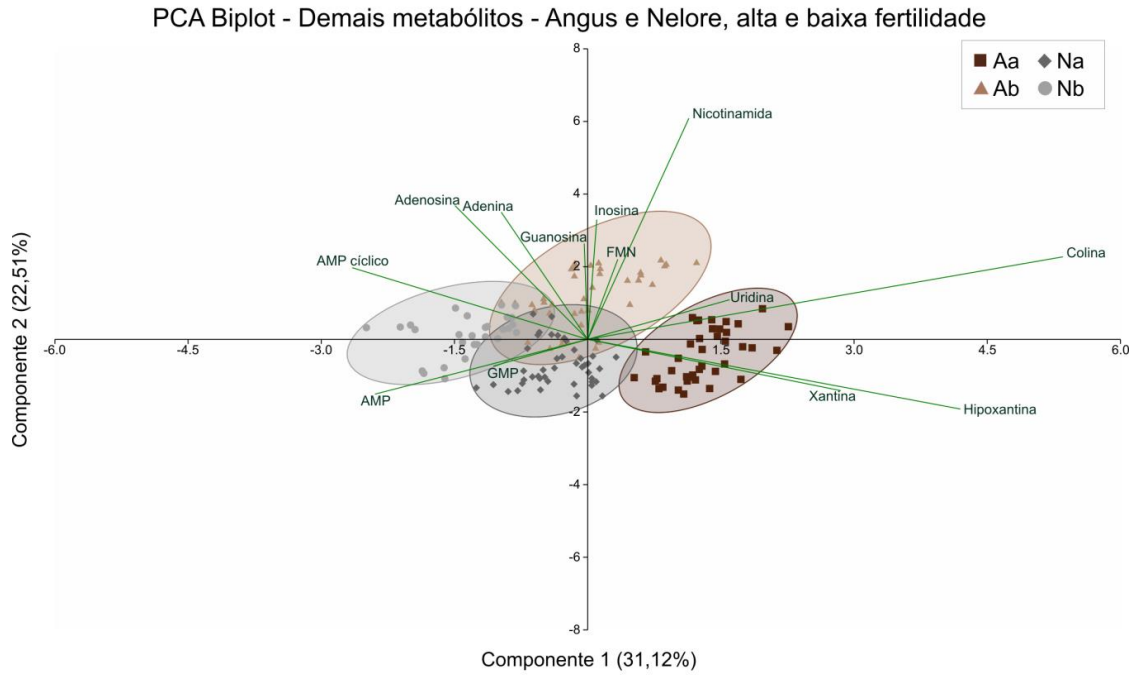
Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartil, limites mínimo e máximo (*whiskers*) e média (+ em laranja); diferenças entre os grupos são marcadas por linhas com o valor de *P* sobre as mesmas. Em A: colina (efeitos fertilidade e raça); Em B: nicotinamida (efeitos fertilidade e raça).

#### 3.4.2.5.2 Resultados de PCA e PLS-DA

Os 15 metabólitos detectados que apresentaram diferença nos grupos estudados foram utilizados inicialmente para as análises multivariadas, com a seleção de 13 deles, após avaliação inicial dos *loadings* e correlação, para PCA e PLS-DA entre os quatro grupos. Os dados foram normalizados com transformação por log e escala centralizada pela média. Na PCA, o componente principal 1 foi responsável por 31,1% da variância e o componente principal 2, por 22,5%, somando 53,6% (Figura 60). Na análise de PLS-DA, a soma dos componentes respondeu por apenas 43,1% da variância (Figura 61A), com a acurácia do modelo de 82% e índices de construção e predição bons ( $R^2=0,841$  e  $Q_2=0,828$ ). Apesar de baixa resposta de variância houve uma separação clara entre os grupos Angus de alta e baixa fertilidade e separação com pequena sobreposição de elipses de IC entre Angus e Nelore de alta fertilidade. Nos resultados de *VIP score*, colina, hipoxantina, AMP cíclico e xantina apresentam os maiores valores (Figura 61B). A influência destes metabólitos na separação dos grupos pode ser observada no gráfico de PCA *biplot* (Figura 60), com colina, hipoxantina e xantina com maior influência sobre o grupo Angus de alta fertilidade.

Figura 60 - PCA em apresentação *biplot* de nucleobases, nucleosídeos, nucleotídeos e demais metabólitos nos quatro grupos estudados (Aa, Ab, Na e Nb)

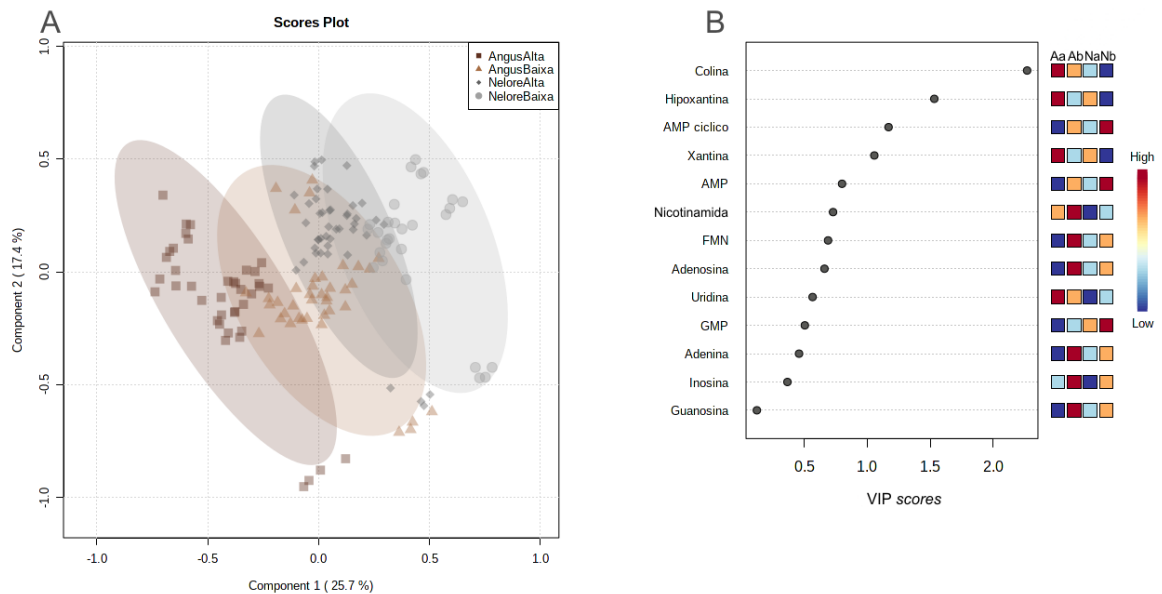


Fonte: Leite (2022)

Representação gráfica da separação entre os grupos Aa, Ab, Na e Nb com os componentes principais 1 e 2, que respondem por uma variância total de 53,6%. A variância explicada pelos componentes é apresentada entre parênteses. Os *clusters* das amostras dos grupos são indicados conforme a legenda e circundados por elipses de IC. As linhas e texto em verde indicam as variáveis selecionadas e a importância das mesmas (escala *eigenvalue*) na variância e separação dos grupos.

Figura 61 - PLS-DA de nucleobases, nucleosídeos, nucleotídeos e demais metabólitos nos quatro grupos estudados (Aa, Ab, Na e Nb)

PLS-DA - Demais Metabólitos - Angus e Nelore, Alta e Baixa Fertilidade



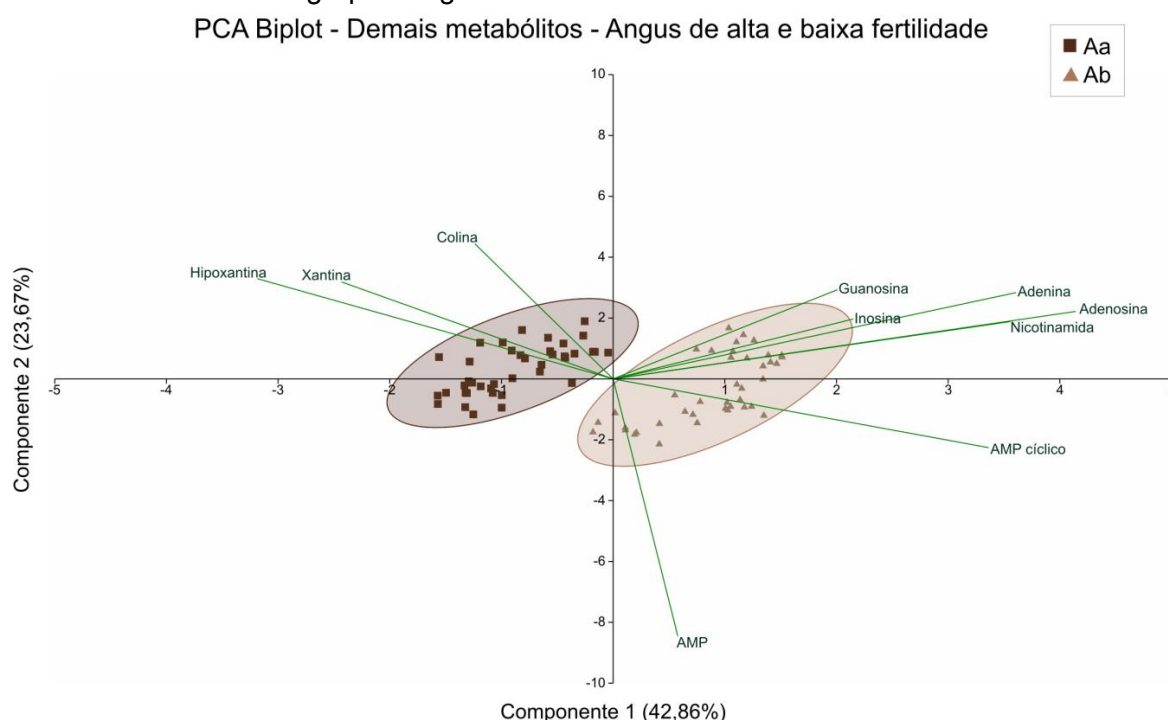
Fonte: Leite (2022)

Em A: *score plot* dos componentes selecionados (1 e 2), que respondem por 43,1% da variância; Em B: *VIP score* do componente 1; o *score* dos metabólitos listados à esquerda está relacionado com a

sua contribuição na variância explicada pelo componente; os quadrados em cores apresentados à direita indicam as concentrações relativas dos metabólitos em cada grupo analisado.

A separação entre os grupos Angus de alta e baixa fertilidade, observada acima, se repetiu nas análises com apenas estes dois grupos com um aumento na resposta da variância. Os dados foram normalizados por log com escala centralizada pela média e após análises prévias de correlação e *fold change*, 13 metabólitos foram selecionados para o modelo de PLS-DA e dez metabólitos para o modelo de PCA. Na PCA, o componente principal 1 foi responsável por 42,9% da variância e o componente principal 2, por 23,7%, com total de 66,5% (Figura 62). Na análise de PLS-DA (validação do modelo com acurácia de 99%,  $R^2=0,898$  e  $Q^2=0,88$ ), apesar da clara separação entre os grupos, os componentes responderam por apenas 44,9% da variância (Figura 63A). Os resultados de *VIP score* (Figura 63B) indicam AMP cíclico, hipoxantina, nicotinamida e adenosina com os maiores valores e a influência dos mesmos pode ser visualizada no gráfico de PCA *biplot*, no qual se observa a influência da hipoxantina sobre o grupo Angus de alta fertilidade e do AMP cíclico, nicotinamida e adenosina sobre o grupo de baixa fertilidade (Figura 62).

Figura 62 - PCA em apresentação *biplot* de nucleobases, nucleosídeos, nucleotídeos e demais metabólitos nos grupos Angus de alta e baixa fertilidade

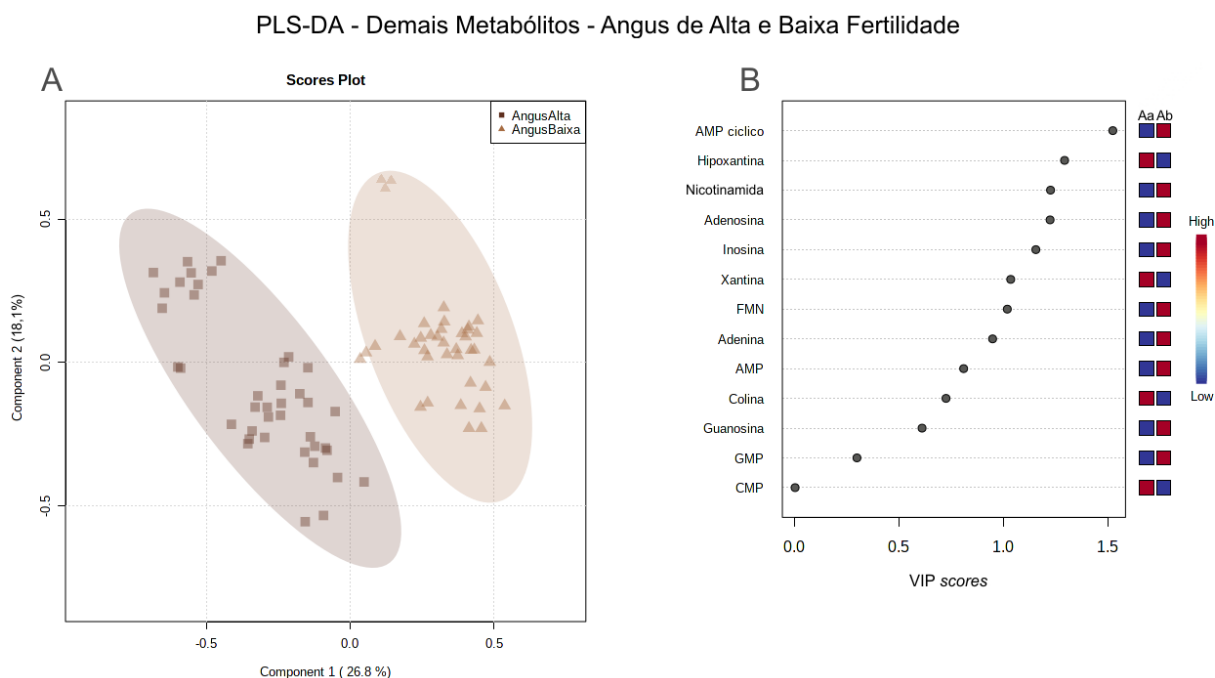


Fonte: Leite (2022)

Representação gráfica da separação entre os grupos Aa e Ab com os componentes principais 1 e 2, que respondem por uma variância total de 66,5%. A variância explicada pelos componentes é apresentada entre parênteses. Os *clusters* das amostras dos grupos são indicados conforme a

legenda e circundados por elipses de IC. As linhas e texto em verde indicam as variáveis selecionadas e a importância das mesmas (escala *eigenvalue*) na variância e separação dos grupos.

Figura 63 - PLS-DA de nucleobases, nucleosídeos, nucleotídeos e demais metabólitos nos grupos Angus de alta e baixa fertilidade

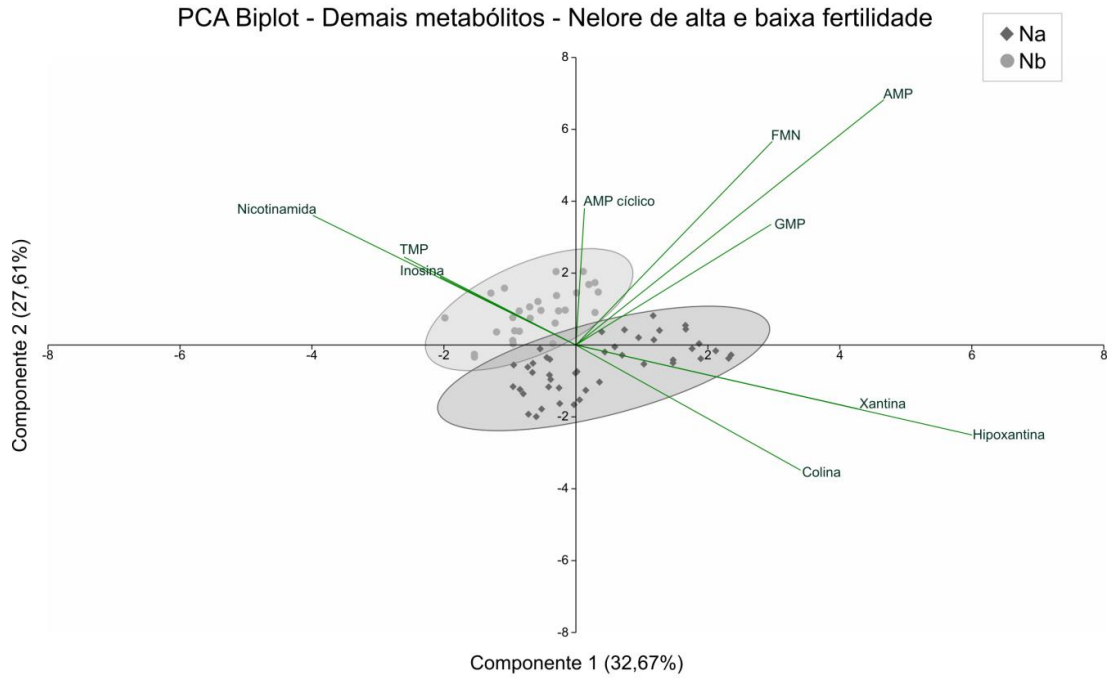


Fonte: Leite (2022)

Em A: *score plot* dos componentes selecionados (1 e 2), que respondem por 44,9% da variância; Em B: VIP score do componente 1; o score dos metabólitos listados à esquerda está relacionado com a sua contribuição na variância explicada pelo componente; os quadrados em cores apresentados à direita indicam as concentrações relativas dos metabólito em cada grupo analisado.

Para os grupos Nelore de alta e baixa fertilidade a resposta de variância das análises de PCA e PLS-DA foi um pouco menor, bem como a separação entre os grupos, com uma pequena sobreposição das elipses de IC. Após normalização dos dados por log com escala centralizada pela média, 15 metabólitos foram utilizados no modelo de PLS-DA e dez foram selecionados para o modelo usado na PCA. Nesta, o componente principal 1 foi responsável por 32,7% da variância e o componente principal 2, por 27,6%, com total de 60,3% (Figura 64). Na análise de PLS-DA (validação do modelo com acurácia de 99%,  $R^2=0,847$  e  $Q^2=0,809$ ), houve uma maior separação entre os grupos, entretanto, os componentes responderam por apenas 48,7% da variância (Figura 65A). Hipoxantina, xantina, nicotinamida, mononucleotídeo de flavina e colina foram os metabólitos que apresentaram os maiores valores de VIP score (Figura 65B). No gráfico *biplot*, a hipoxantina, xantina e colina apresentaram maior influência sobre o grupo de alta fertilidade, enquanto a nicotinamida teve maior influência no grupo de baixa fertilidade (Figura 64).

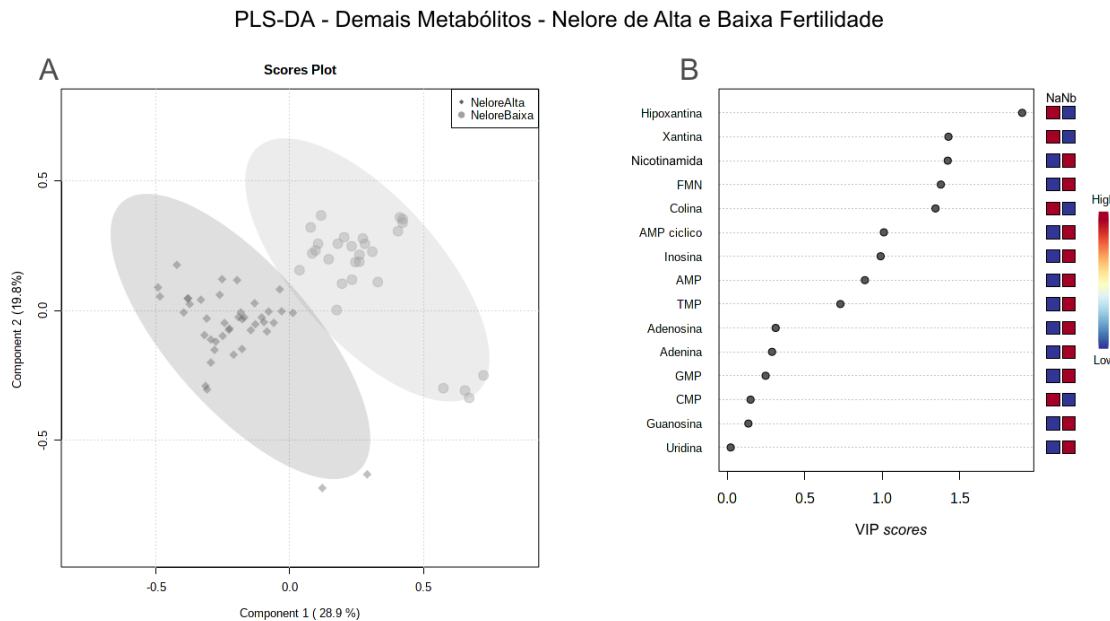
Figura 64 - PCA em apresentação *biplot* de nucleobases, nucleosídeos, nucleotídeos e demais metabólitos nos grupos Nelore de alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

Representação gráfica da separação entre os grupos Na e Nb com os componentes principais 1 e 2, que respondem por uma variância total de 60,3%. A variância explicada pelos componentes é apresentada entre parênteses. Os *clusters* das amostras dos grupos são indicados conforme a legenda e circundados por elipses de IC. As linhas e texto em verde indicam as variáveis selecionadas e a importância das mesmas (escala *eigenvalue*) na variância e separação dos grupos.

Figura 65 - PLS-DA de nucleobases, nucleosídeos, nucleotídeos e demais metabólitos nos grupos Nelore de alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

Em A: *score plot* dos componentes selecionados (1 e 2), que respondem por 48,7% da variância; Em B: VIP score do componente 1; o score dos metabólitos listados à esquerda está relacionado com a

sua contribuição na variância explicada pelo componente; os quadrados em cores apresentados à direita indicam as concentrações relativas dos metabólitos em cada grupo analisado.

### 3.4.3 POTENCIAIS BIOMARCADORES

Os dados foram submetidos às análises multivariadas e univariadas de biomarcadores, baseadas na curva ROC (característica de operação do receptor), no MetaboAnalyst com a mesma normalização realizada para PCA e PLS-DA. A análise exploratória multivariada de curva ROC foi utilizada para avaliar o desempenho de modelos de biomarcadores para a identificação de variáveis importantes e o comportamento de agrupamento destas. A análise clássica univariada foi utilizada para a avaliação do desempenho de variáveis individualmente, apresentando a sensibilidade e especificidade de um metabólito para classificar de forma acurada as amostras dos grupos analisados. Essa acurácia é determinada pela área sob a curva ROC (AUC). O algoritmo utilizado foi o SVM (*support vector machines* - máquina de vetores de suporte), um método de aprendizado supervisionado para analisar dados e reconhecer padrões. Os resultados de potenciais biomarcadores são apresentados abaixo de acordo com as diferentes classes de metabólitos e divididos entre as raças Angus e Nelore. As tabelas apresentam apenas metabólitos com AUC acima de 0,8 (classificação pela AUC). Quando não houve identificação de metabólitos acima deste padrão, o valor limite de AUC é mencionado na tabela. Além de AUC são apresentados o intervalo de confiança (IC, 95%), sensibilidade, especificidade e resultados de Teste-T (valor de *P* apresentado em notação científica). A partir dos resultados da tabela, as curvas ROC de dois metabólitos foram selecionadas e apresentadas em gráficos e *boxplot* de separação entre os grupos. Por fim, foi realizada a testagem destes biomarcadores no próprio sistema do MetaboAnalyst (*Tester*), com resultados apresentados em gráficos de probabilidade de predição.

### 3.4.3.1 Lipídios

#### Angus de alta e baixa fertilidade

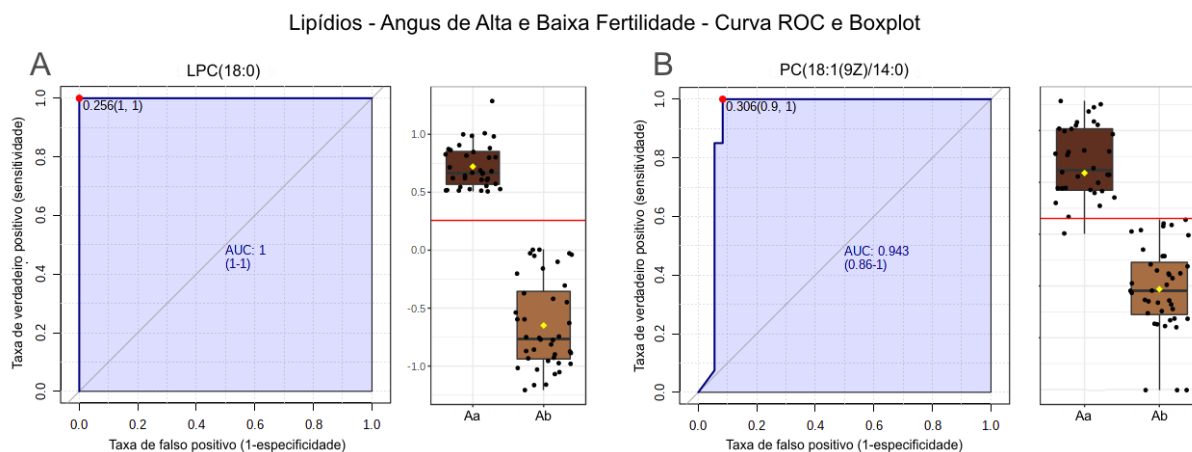
Tabela 31 - Lipídios selecionados com acurácia acima de 0,8 para os grupos Angus de alta e baixa fertilidade

Lipídios	AUC	IC (95%)	Sensitividade	Especificidade	P (Teste T)
LPC(18:0)	1,000	1-1	1,000	1,000	6,30E-31
PC(16:1(9Z)/16:1(9Z))	1,000	1-1	1,000	1,000	2,62E-33
PC(20:4/16:0)	1,000	1-1	1,000	1,000	4,22E-32
PC(16:0/18:2(9Z,12Z))	1,000	1-1	1,000	1,000	7,67E-32
PC(18:1(9Z)/18:0)	1,000	1-1	1,000	1,000	7,48E-31
SM(d18:1/24:0)	1,000	1-1	1,000	1,000	1,30E-33
SM(d18:1/16:0)	0,999	0,996-1	0,975	1,000	9,30E-27
SM(d18:1/24:1(15Z))	0,997	0,998-1	1,000	0,972	1,14E-21
PC(18:0/18:2(9Z,12Z))	0,997	0,986-1	1,000	0,972	7,70E-24
PC(16:0/14:0)	0,994	0,979-1	0,950	1,000	3,34E-20
SM(d18:1/18:0)	0,994	0,981-1	0,975	0,944	1,43E-23
PC(18:0/14:0)	0,990	0,974-1	0,925	0,944	7,15E-23
PC(18:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	0,963	0,908-0,998	0,900	0,944	3,75E-15
PC(18:1(9Z)/14:0)	0,942	0,86-1	1,000	0,917	3,19E-14
LPC(16:0/0:0)	0,941	0,891-0,981	0,850	0,889	1,32E-14
SM(d18:1/16:1)	0,919	0,818-1	1,000	0,917	1,73E-11
PC(38:6)	0,907	0,837-0,968	0,750	1,000	1,67E-11
LPC(18:1)	0,906	0,841-0,958	0,775	0,861	2,29E-12
PC(17:0/17:0)	0,901	0,826-0,957	0,725	0,861	6,85E-12
PC(18:0/22:6)	0,899	0,826-0,961	0,800	0,833	2,84E-09

Fonte: Leite (2022)

Colunas com valor de AUC (área sob a curva ROC, acurácia), intervalo de confiança, sensibilidade, especificidade e P de teste-T (em notação científica).

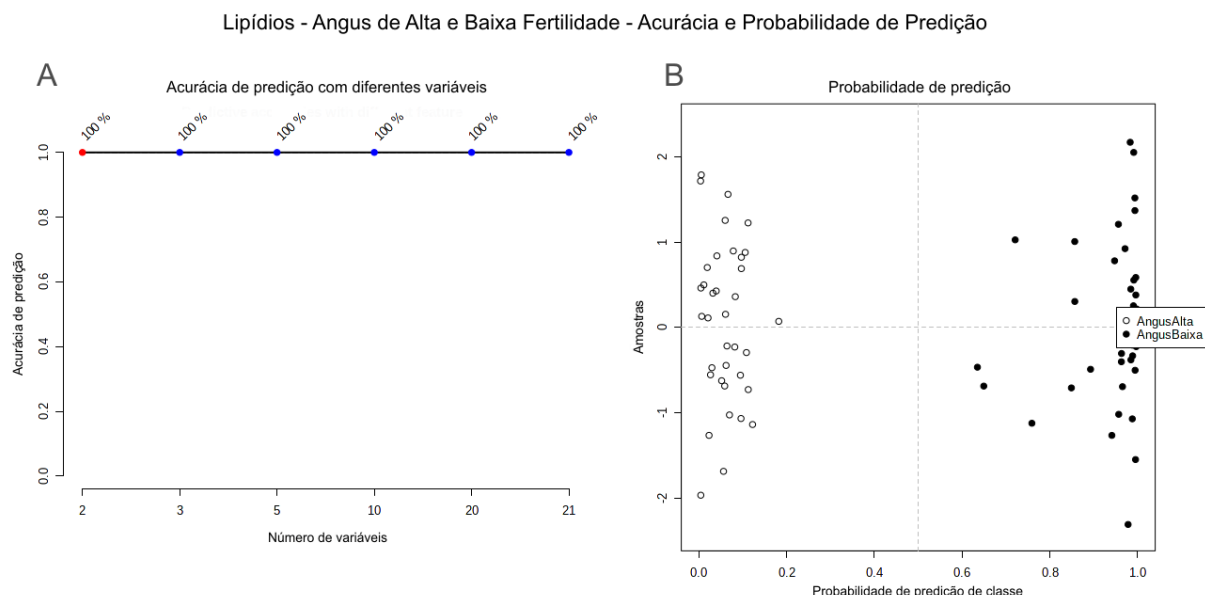
Figura 66 - Curva ROC e *boxplot* de lipídios para ilustrar a acurácia e separação entre os grupos Angus de alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

Análise univariada de curva ROC e *boxplot* de dois dos lipídios listados na tabela acima. Em A: LPC(18:0), curva ROC com valor de AUC 1 (sensitividade=1 e especificidade=1) e *boxplot* ilustrando separação de amostras; Em B: PC(18:1(9Z)/14:0), curva ROC com valor de AUC 0,942 (sensitividade=1 e especificidade=0,917) e *boxplot* ilustrando separação de amostras.

Figura 67 - Análise multivariada de biomarcadores da classe de lipídios em grupos Angus de alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

Em A: gráfico indicando acurácia de 100% no uso de 2 a 21 lipídios para a separação dos grupos. Em B: gráfico resultante do uso do *MetaboAnalyst Tester* para verificação de biomarcadores; o gráfico apresenta a separação dos grupos com uso de 10 lipídios com maior valor de AUC, com valor de  $P$  empírico  $<0,001$ .

### Nelore de alta e baixa fertilidade

Tabela 32 - Lipídios selecionados com acurácia acima de 0,8 para os grupos Nelore de alta e baixa fertilidade

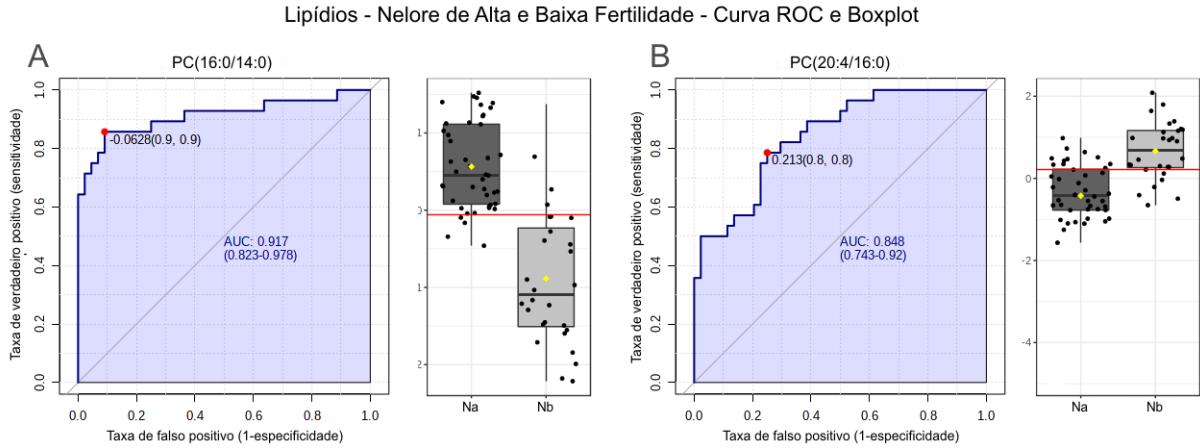
Lipídios	AUC	IC (95%)	Sensitividade	Especificidade	$P$ (Teste T)
PC(16:0/14:0)	0,91153	0,823-0,978	0,857	0,909	2,37E-12
SM(d18:1/24:0)	0,87581	0,785-0,951	0,821	0,818	1,23E-08
SM(d18:1/18:0)	0,86607	0,776-0,942	0,714	0,909	2,05E-09
PC(16:0/18:2(9Z,12Z))	0,85065	0,757-0,935	0,929	0,750	2,63E-08
PC(20:4/16:0)	0,84334	0,743-0,920	0,786	0,750	1,24E-06
PC(16:1(9Z)/16:1(9Z))	0,84172	0,728-0,944	0,821	0,909	1,84E-05
SM(d18:1/16:0)	0,82305	0,719-0,913	0,750	0,773	2,03E-06
LPC(17:1(10Z)/0:0)	0,81859	0,707-0,920	0,929	0,795	0,002838
SM(d18:1/16:1)	0,81737	0,710-0,908	0,821	0,727	3,80E-06
PC(18:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	0,80925	0,713-0,895	0,821	0,727	1,03E-06

Fonte: Leite (2022)

Colunas com valor de AUC (área sob a curva ROC, acurácia), intervalo de confiança, sensibilidade, especificidade e  $P$  de teste-T (em notação científica).



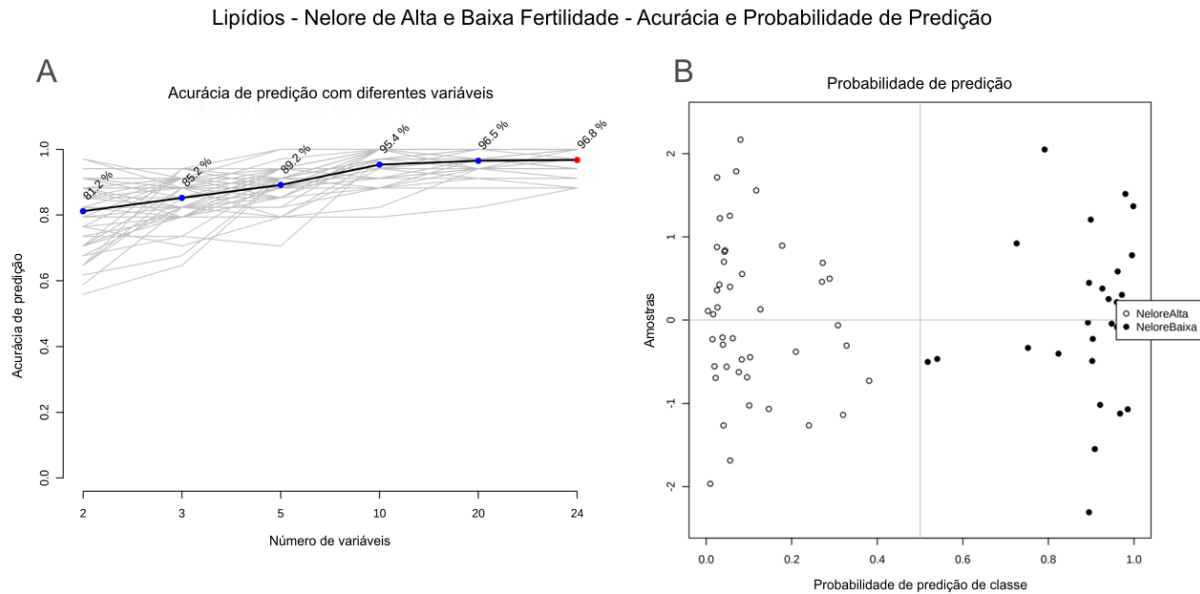
Figura 68 - Curva ROC e *boxplot* de lipídios para ilustrar a acurácia e separação entre os grupos Nelore de alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

Análise univariada de curva ROC e *boxplot* de dois dos lipídios listados na tabela acima. Em A: PC(16:0/14:0), curva ROC com valor de AUC 0,912 (sensitividade=0,857 e especificidade=0,909) e *boxplot* ilustrando separação de amostras; em B: PC(20:4/16:0), curva ROC com valor de AUC 0,843 (sensitividade=0,786 e especificidade=0,750) e *boxplot* ilustrando separação de amostras.

Figura 69 - Análise multivariada de biomarcadores da classe de lipídios em grupos Nelore de alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

Em A: gráfico indicando a porcentagem de acurácia no uso de 2 a 24 lipídios para a separação dos grupos. Em B: gráfico resultante do uso do *MetaboAnalyst Tester* para verificação de biomarcadores; o gráfico apresenta a separação dos grupos com uso de 10 lipídios com maior valor de AUC (acurácia de predição de 95,4%), com valor de *P* empírico <0,001.

### 3.4.3.2 Carnitinas

#### Angus de alta e baixa fertilidade

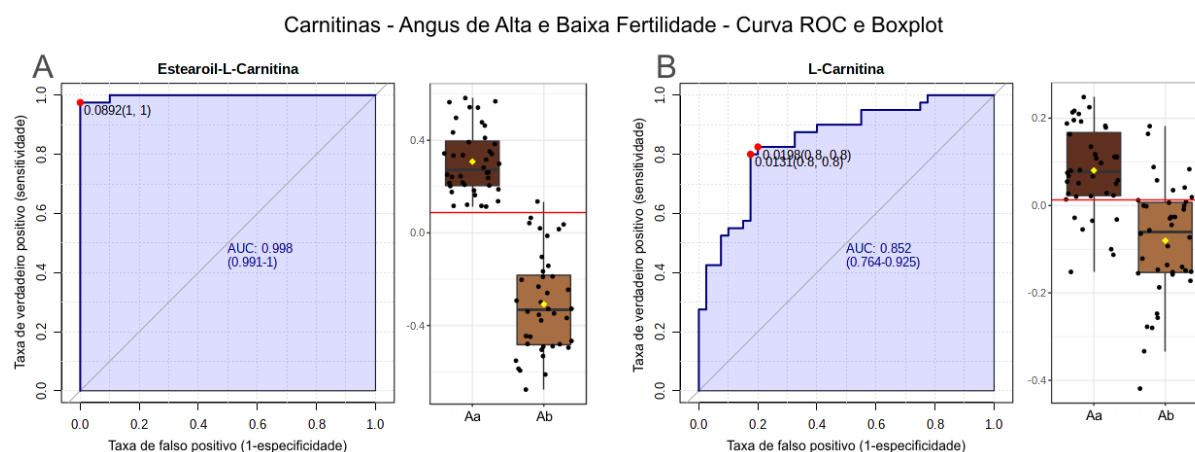
Tabela 33 - Carnitinas selecionadas com acurácia acima de 0,8 para os grupos Angus de alta e baixa fertilidade

Carnitinas	AUC	IC (95%)	Sensitividade	Especificidade	P (Teste T)
Estearoil-L-carnitina	0,9975	0,991-1	0,975	1	4,79E-25
Palmitoil-L-carnitina	0,99312	0,978-1	0,95	0,975	9,88E-24
Propionil-L-carnitina	0,88375	0,801-0,943	0,775	0,875	2,15E-10
L-carnitina	0,84625	0,764-0,925	0,825	0,8	2,76E-08
Acetilcarnitina	0,84312	0,749-0,924	0,675	0,9	1,60E-09

Fonte: Leite (2022)

Colunas com valor de AUC (área sob a curva ROC, acurácia), intervalo de confiança, sensibilidade, especificidade e P de teste-T (em notação científica).

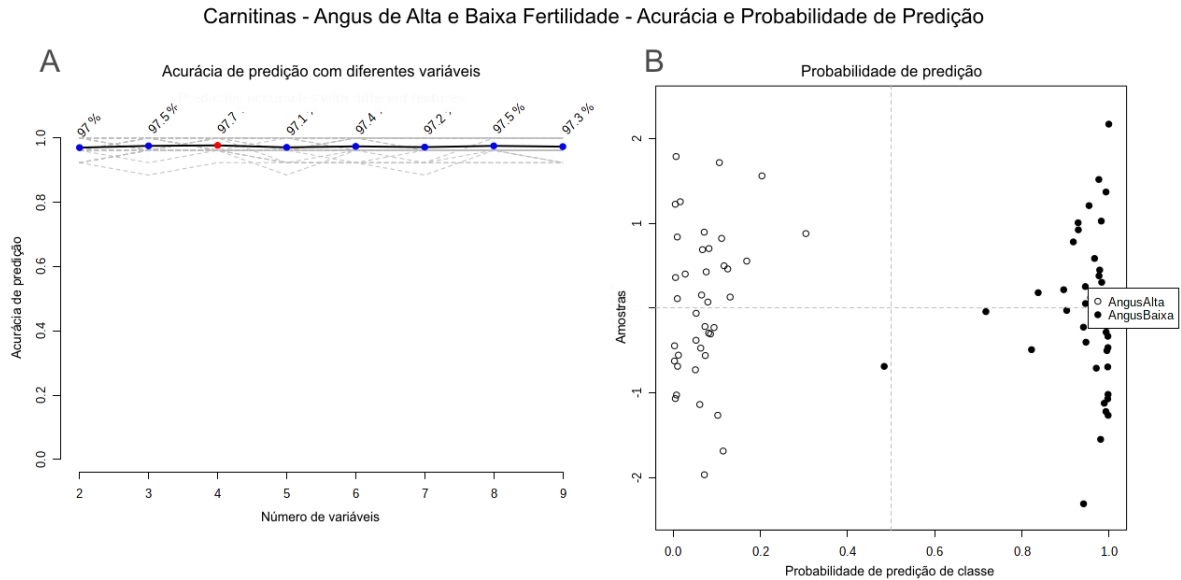
Figura 70 - Curva ROC e *boxplot* de carnitinas para ilustrar a acurácia e separação entre os grupos Angus de alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

Análise univariada de curva ROC e *boxplot* de duas carnitinas listadas na tabela acima. Em A: estearoil-L-carnitina, curva ROC com valor de AUC de 0,997 (sensitividade=0,975 e especificidade=1) e *boxplot* ilustrando separação de amostras; em B: L-carnitina, curva ROC com valor de AUC de 0,846 (sensitividade=0,825 e especificidade=0,8) e *boxplot* ilustrando separação de amostras.

Figura 71 - Análise multivariada de biomarcadores da classe de carnitinas em grupos Angus de alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

Em A: gráfico indicando acurácia de 97,7% no uso de quatro das nove carnitinas para a separação dos grupos. Em B: gráfico resultante do uso do *MetaboAnalyst Tester* para verificação de biomarcadores; o gráfico apresenta a separação dos grupos com uso de quatro carnitinas com maior valor de AUC, com valor de *P* empírico <0,001.

**Nelore de alta e baixa fertilidade**

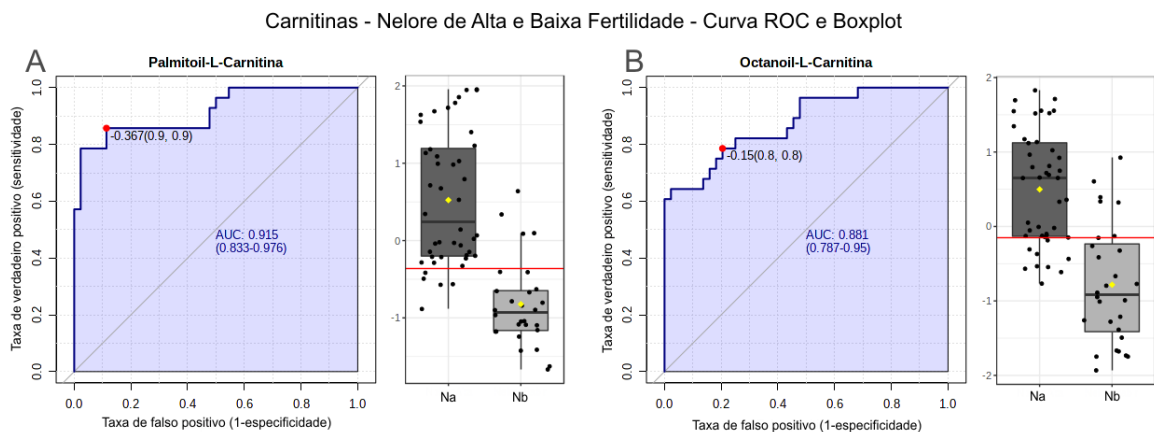
Tabela 34 - Carnitinas selecionadas com acurácia acima de 0,8 para os grupos Nelore de alta e baixa fertilidade

Carnitinas	AUC	IC (95%)	Sensitividade	Especificidade	<i>P</i> (Teste T)
Palmitoil-L-carnitina	0,91558	0,833-0,976	0,857	0,886	2,64E-10
Octanoil-L-carnitina	0,87581	0,787-0,950	0,786	0,795	3,35E-09

Fonte: Leite (2022)

Colunas com valor de AUC (área sob a curva ROC, acurácia), intervalo de confiança, sensibilidade, especificidade e *P* de teste-T (em notação científica).

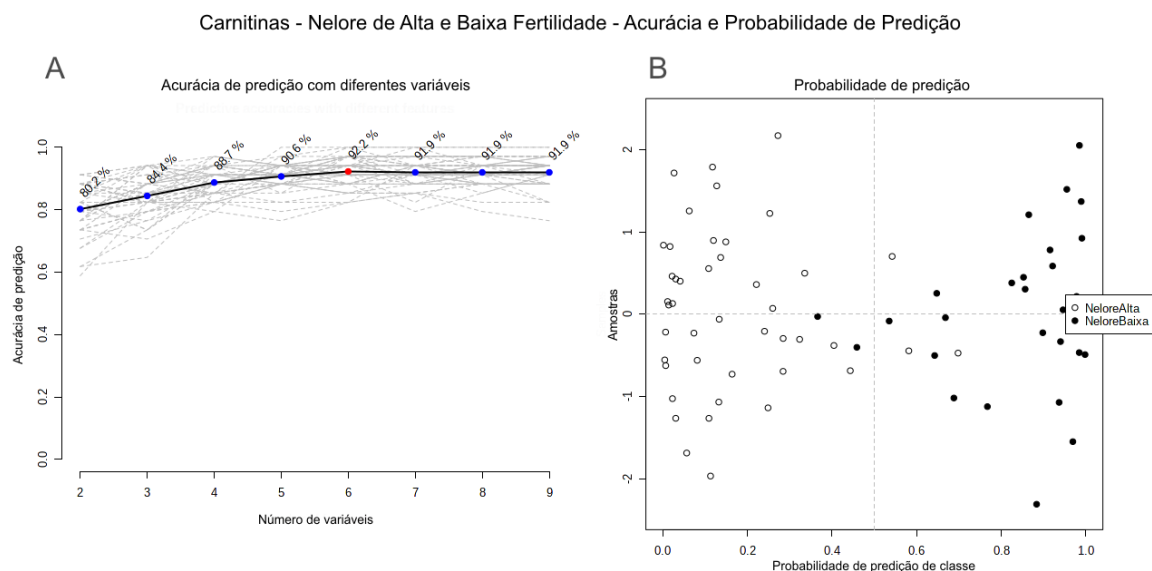
Figura 72 - Curva ROC e *boxplot* de carnitinas para ilustrar a acurácia e separação entre os grupos Nelore de alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

Análise univariada de curva ROC e *boxplot* de duas carnitinas listadas na tabela acima. Em A: palmitoil-L-carnitina, curva ROC com valor de AUC de 0,915 (sensitividade=0,857 e especificidade=0,886) e *boxplot* ilustrando separação de amostras; em B: octanoil-L-carnitina, curva ROC com valor de AUC de 0,875 (sensitividade=0,786 e especificidade=0,795) e *boxplot* ilustrando separação de amostras.

Figura 73 - Análise multivariada de biomarcadores da classe de carnitinas em grupos Nelore de alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

Em A: gráfico indicando acurácia de 92,2% no uso de seis das nove carnitinas para a separação dos grupos. Em B: gráfico resultante do uso do *MetaboAnalyst Tester* para verificação de biomarcadores; o gráfico apresenta a separação dos grupos com uso de seis carnitinas com maior valor de AUC, com valor de  $P$  empírico  $<0,001$ .

### 3.4.3.3 Peptídeos, aminoácidos e derivados

#### Angus de alta e baixa fertilidade

Tabela 35 - Peptídeos, aminoácidos e derivados selecionados com acurácia acima de 0,8 para os grupos Angus de alta e baixa fertilidade

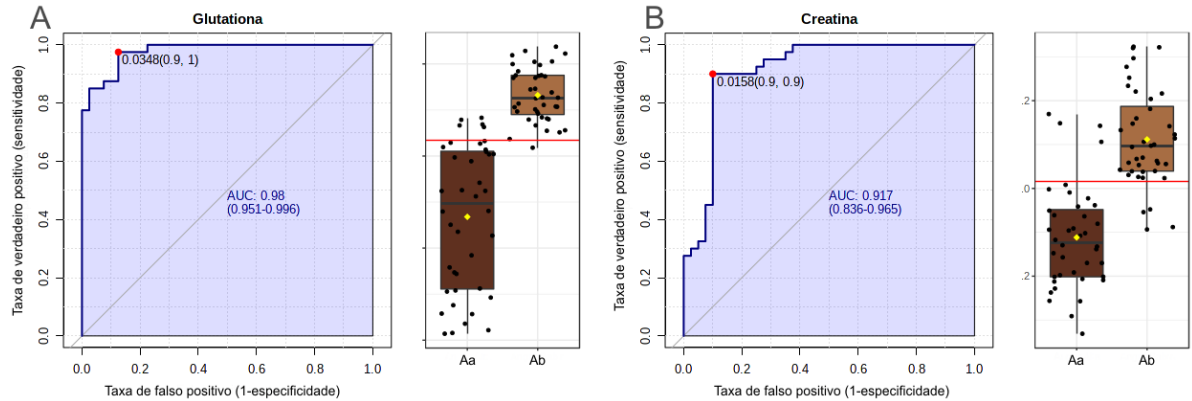
Metabólitos	AUC	IC (95%)	Sensitividade	Especificidade	$P$ (Teste T)
Glutaciona	0.97812	0.951-0.996	0.975	0.875	1.43E-15
Glutaciona oxidada	0.97438	0.938-0.995	1	0.875	5.00E-21
Creatina	0.9125	0.833-0.965	0.9	0.9	3.48E-13
Metionina	0.91062	0.844-0.962	0.75	1	5.54E-15
Ácido glutâmico	0.85688	0.77-0.929	0.75	0.9	4.54E-11

Fonte: Leite (2022)

Colunas com valor de AUC (área sob a curva ROC, acurácia), intervalo de confiança, sensibilidade, especificidade e  $P$  de teste-T (em notação científica).

Figura 74 - Curva ROC e *boxplot* de peptídeos aminoácidos e derivados para ilustrar a acurácia e separação entre os grupos Angus de alta e baixa fertilidade

Peptídeos, Aminoácidos e Derivados - Angus de Alta e Baixa Fertilidade - Curva ROC e Boxplot

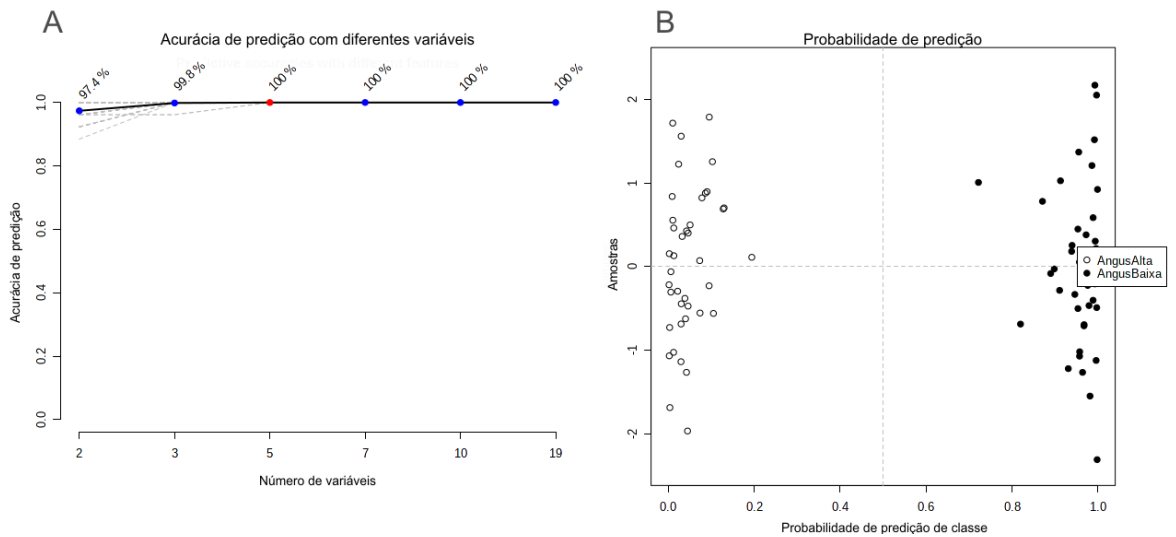


Fonte: Leite (2022)

Análise univariada de curva ROC e *boxplot* de dois dos metabólitos listados na tabela acima. Em A: glutamina, curva ROC com valor de AUC de 0,978 (sensitividade=0,975 e especificidade=0,875) e *boxplot* ilustrando separação de amostras; em B: creatina, curva ROC com valor de AUC de 0,913 (sensitividade=0,9 e especificidade=0,9) e *boxplot* ilustrando separação de amostras.

Figura 75 - Análise multivariada de biomarcadores da classe peptídeos, aminoácidos e derivados em grupos Angus de alta e baixa fertilidade

Peptídeos, Aminoácidos e Derivados - Angus de Alta e Baixa Fertilidade - Acurácia e Probabilidade de Predição



Fonte: Leite (2022)

Em A: gráfico indicando acurácia de predição com diferentes quantidades de metabólitos para a separação dos grupos. Em B: gráfico resultante do uso do *MetaboAnalyst Tester* para verificação de biomarcadores; o gráfico apresenta a separação dos grupos com uso de cinco metabólitos com maior valor de AUC, com valor de P empírico <0,001.

## Nelore de alta e baixa fertilidade

Tabela 36 - Peptídeos, aminoácidos e derivados selecionados com acurácia acima de 0,75 para os grupos Nelore de alta e baixa fertilidade

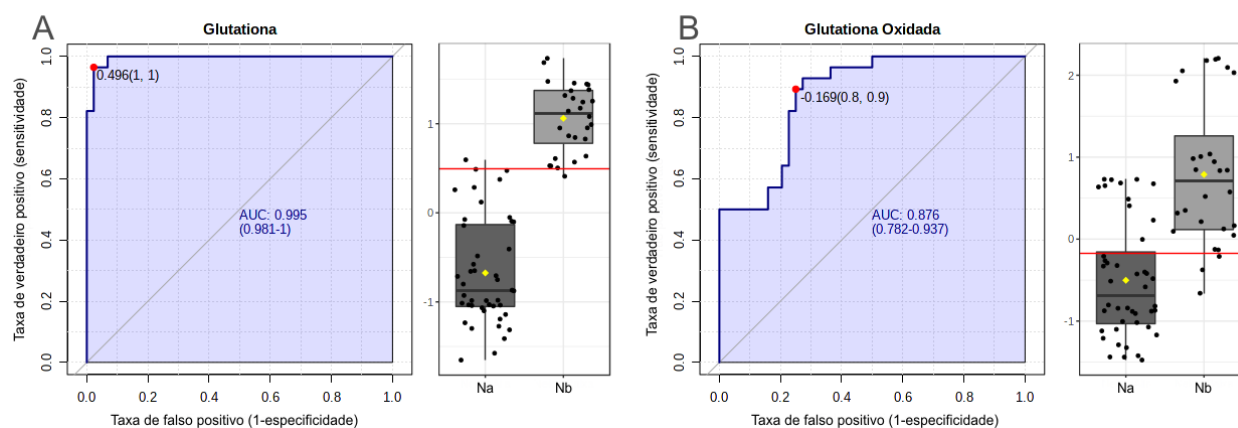
Aminoácidos e derivados	AUC	IC (95%)	Sensitividade	Especificidade	P (Teste T)
Glutaciona	0.99432	0.981-1	0.964	0.977	2.22E-21
Glutaciona Oxidada	0.875	0.782-0.937	0.893	0.75	2.29E-09
Glutamina	0.78896	0.671-0.882	0.714	0.773	1.30E-05
Ácido Aspártico	0.75731	0.636-0.869	0.679	0.841	5.23E-05

Fonte: Leite (2022)

Colunas com valor de AUC (área sob a curva ROC, acurácia), intervalo de confiança, sensibilidade, especificidade e *P* de teste-T (em notação científica).

Figura 76 - Curva ROC e *boxplot* de peptídeos, aminoácidos e derivados para ilustrar a acurácia e separação entre os grupos Nelore de alta e baixa fertilidade

Peptídeos, Aminoácidos e Derivados - Nelore de Alta e Baixa Fertilidade - Curva ROC e Boxplot

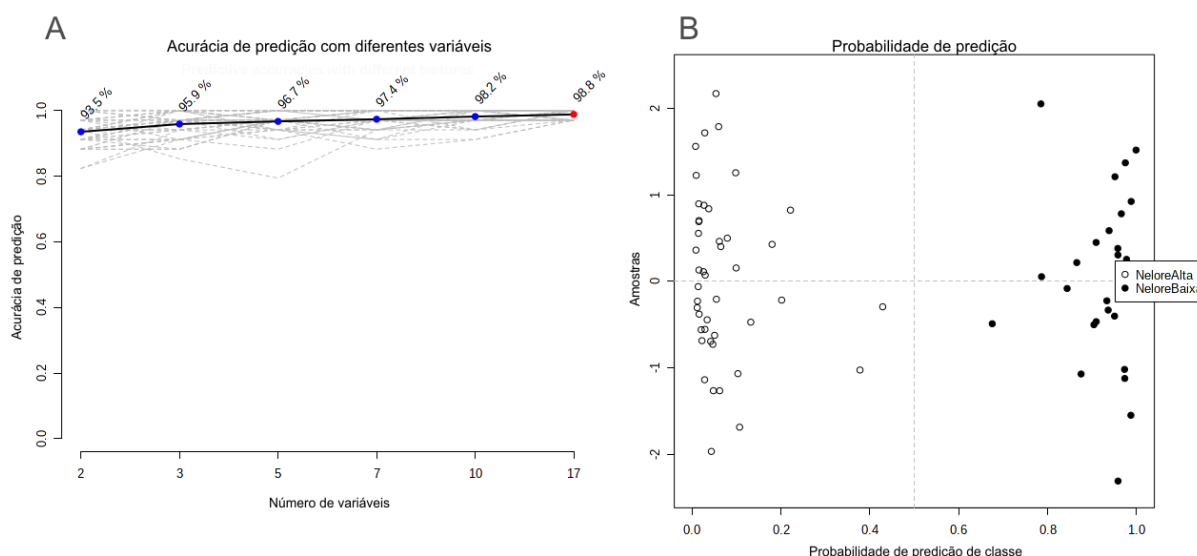


Fonte: Leite (2022)

Análise univariada de curva ROC e *boxplot* de dois dos metabólitos listados na tabela acima. Em A: glutaciona, curva ROC com valor de AUC de 0,994 (sensitividade=0,964 e especificidade=0,977) e *boxplot* ilustrando separação de amostras; em B: glutaciona oxidada, curva ROC com valor de AUC de 0,875 (sensitividade=0,893 e especificidade=0,75) e *boxplot* ilustrando separação de amostras.

Figura 77 - Análise multivariada de biomarcadores da classe peptídeos, aminoácidos e derivados em grupos Nelore de alta e baixa fertilidade

Peptídeos, Aminoácidos e Derivados - Nelore de Alta e Baixa Fertilidade - Acurácia e Probabilidade de Predição



Fonte: Leite (2022)

Em A: gráfico indicando acurácia de predição com diferentes quantidades de metabólitos para a separação dos grupos. Em B: gráfico resultante do uso do *MetaboAnalyst Tester* para verificação de biomarcadores; o gráfico apresenta a separação dos grupos com uso de 10 metabólitos com maior valor de AUC, com valor de P empírico <0,001.

### 3.4.3.4 Ácidos orgânicos

#### Angus de alta e baixa fertilidade

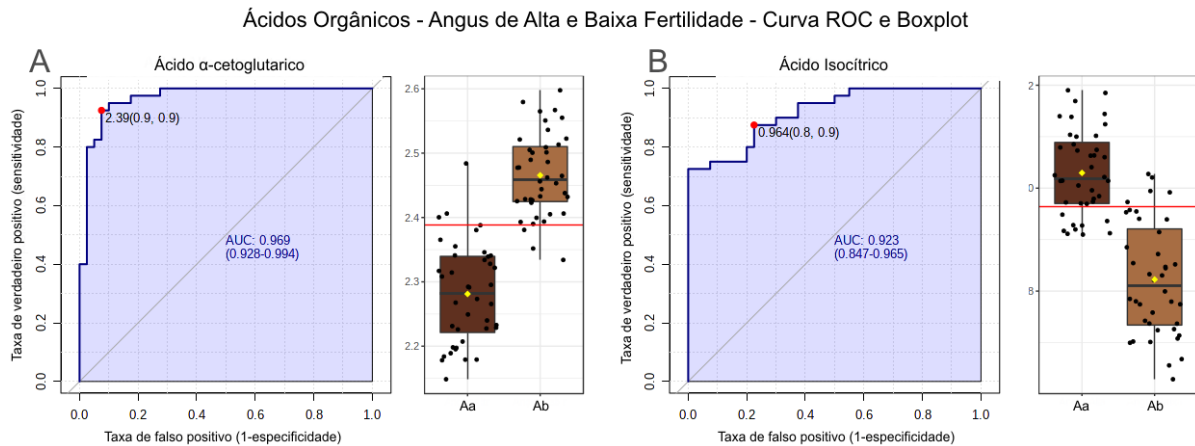
Tabela 37 - Ácidos orgânicos selecionados com acurácia acima de 0,8 para os grupos Angus de alta e baixa fertilidade

Ácidos orgânicos	AUC	IC (95%)	Sensitividade	Especificidade	P (Teste T)
Ácido $\alpha$ -cetoglutárico	0,9675	0,931-0,995	0,9	0,925	2,07E-18
Ácido $\gamma$ -aminobutírico	0,95031	0,905-0,984	0,85	0,85	3,68E-17
Ácido Isocítrico	0,91875	0,847-0,965	0,875	0,775	1,14E-14
Ácido Adenilsuccínico	0,86219	0,751-0,927	0,75	0,725	2,19E-10
Ácido Cítrico	0,84062	0,753-0,909	0,65	0,8	8,42E-09
Ácido Láctico	0,83812	0,74-0,915	0,775	0,725	3,50E-09

Fonte: Leite (2022)

Colunas com valor de AUC (área sob a curva ROC, acurácia), intervalo de confiança, sensibilidade, especificidade e P de teste-T (em notação científica).

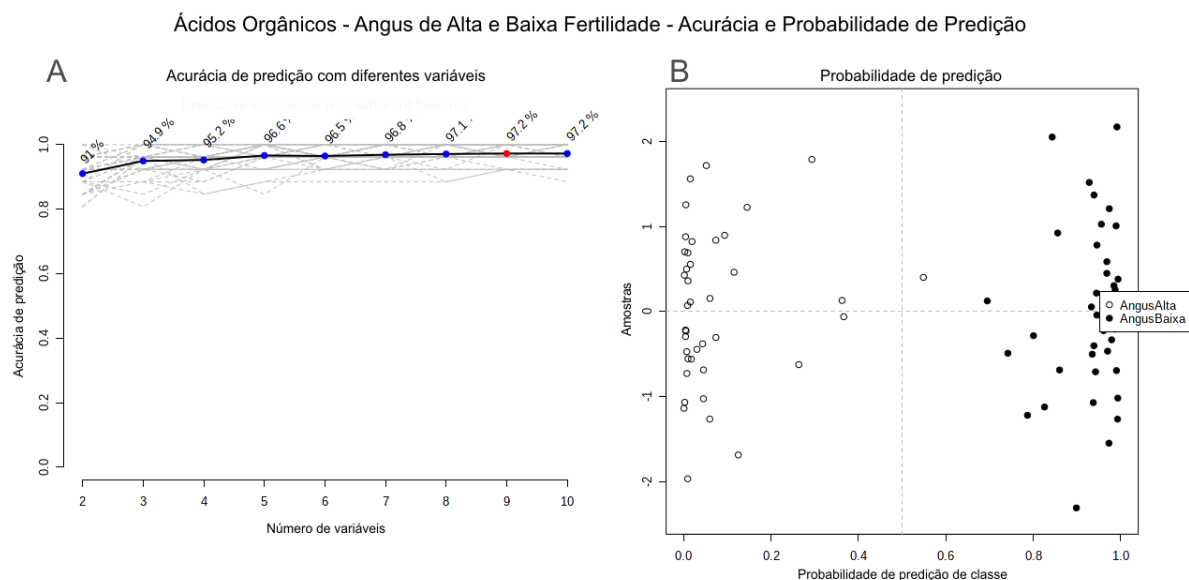
Figura 78 - Curva ROC e *boxplot* de ácidos orgânicos para ilustrar a acurácia e separação entre os grupos Angus de alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

Análise univariada de curva ROC e *boxplot* de dois dos metabólitos listados na tabela acima. Em A: ácido  $\alpha$ -cetoglutarico, curva ROC com valor de AUC de 0,968 (sensitividade=0,9 e especificidade=0,925) e *boxplot* ilustrando separação de amostras; em B: ácido isocítrico, curva ROC com valor de AUC de 0,919 (sensitividade=0,875 e especificidade=0,775) e *boxplot* ilustrando separação de amostras.

Figura 79 - Análise multivariada de biomarcadores de ácidos orgânicos em grupos Angus de alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

Em A: gráfico indicando acurácia de predição com diferentes quantidades de metabólitos para a separação dos grupos. Em B: gráfico resultante do uso do *MetaboAnalyst Tester* para verificação de biomarcadores; o gráfico apresenta a separação dos grupos com uso de nove metabólitos com maior valor de AUC, com valor de  $P$  empírico  $<0,001$ .



## Nelore de alta e baixa fertilidade

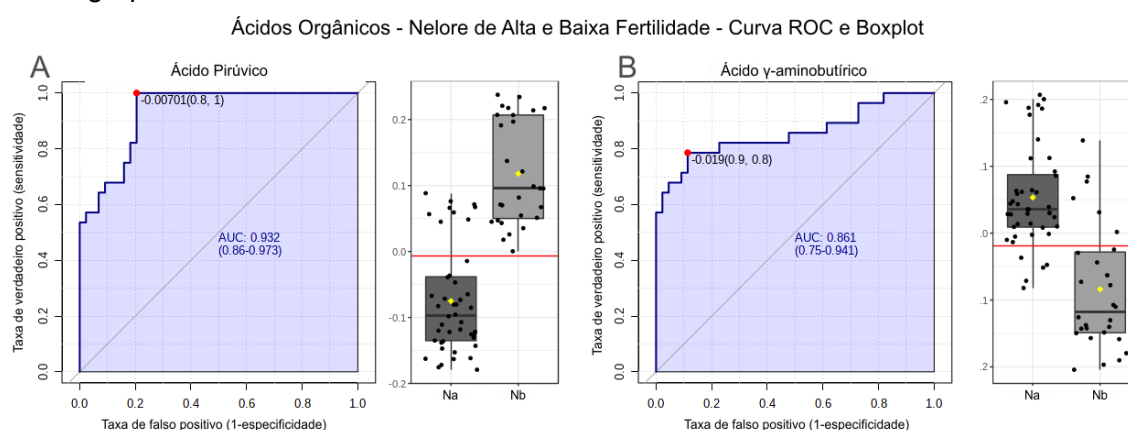
Tabela 38 - Ácidos orgânicos selecionados com acurácia acima de 0,8 para os grupos Nelore de alta e baixa fertilidade

Ácidos orgânicos	AUC	IC (95%)	Sensitividade	Especificidade	P (Teste T)
Ácido Pirúvico	0,93019	0,86-0,973	1	0,795	5,27E-15
Ácido $\gamma$ -aminobutírico	0,85714	0,75-0,941	0,786	0,886	2,71E-09
Ácido Adenilsuccínico	0,83685	0,704-0,949	0,786	0,886	2,70E-10

Fonte: Leite (2022)

Colunas com valor de AUC (área sob a curva ROC, acurácia), intervalo de confiança, sensibilidade, especificidade e P de teste-T (em notação científica).

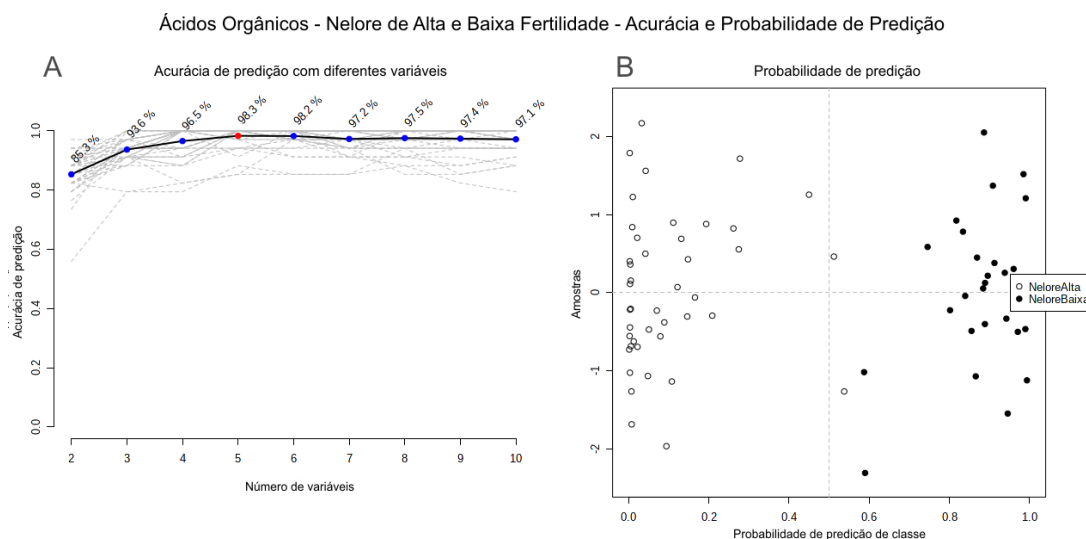
Figura 80 - Curva ROC e *boxplot* de ácidos orgânicos para ilustrar a acurácia e separação entre os grupos Nelore de alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

Análise univariada de curva ROC e *boxplot* de dois dos metabólitos listados na tabela acima. Em A: ácido pirúvico, curva ROC com valor de AUC de 0,930 (sensitividade=1 e especificidade=0,795) e *boxplot* ilustrando separação de amostras; em B: ácido  $\gamma$ -aminobutírico, curva ROC com valor de AUC de 0,857 (sensitividade=0,786 e especificidade=0,886) e *boxplot* ilustrando separação de amostras.

Figura 81 - Análise multivariada de biomarcadores de ácidos orgânicos em grupos Nelore de alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

Em A: gráfico indicando acurácia de predição com diferentes quantidades de metabólitos para a separação dos grupos. Em B: gráfico resultante do uso do MetaboAnalyst Tester para verificação de biomarcadores; o gráfico apresenta a separação dos grupos com uso de cinco metabólitos com maior valor de AUC, com valor de  $P$  empírico  $<0,001$ .

### 3.4.3.5 Nucleobases, nucleosídeos, nucleotídeos e demais metabólitos

#### Angus de alta e baixa fertilidade

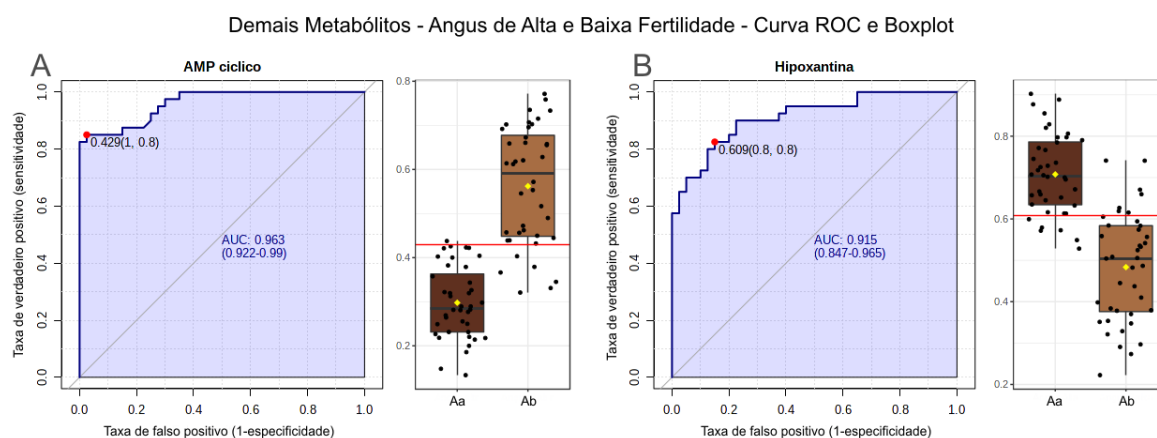
Tabela 39 - Demais metabólitos selecionados com acurácia acima de 0,8 para os grupos Angus de alta e baixa fertilidade

Metabólitos	AUC	IC (95%)	Sensitividade	Especificidade	$P$ (Teste T)
AMP cíclico	0,96031	0,922-0,99	0,85	0,975	7,13E-17
Hipoxantina	0,91188	0,847-0,965	0,825	0,85	5,64E-13
Nicotinamida	0,88312	0,804-0,948	0,85	0,725	1,99E-12
Adenosina	0,8825	0,801-0,943	0,75	0,775	1,69E-10
Xantina	0,83344	0,738-0,925	0,85	0,75	0,010716
Adenina	0,80125	0,703-0,906	0,7	0,875	1,83E-07
Inosina	0,8	0,694-0,904	0,925	0,7	5,11E-05

Fonte: Leite (2022)

Colunas com valor de AUC (área sob a curva ROC, acurácia), intervalo de confiança, sensibilidade, especificidade e  $P$  de teste-T (em notação científica).

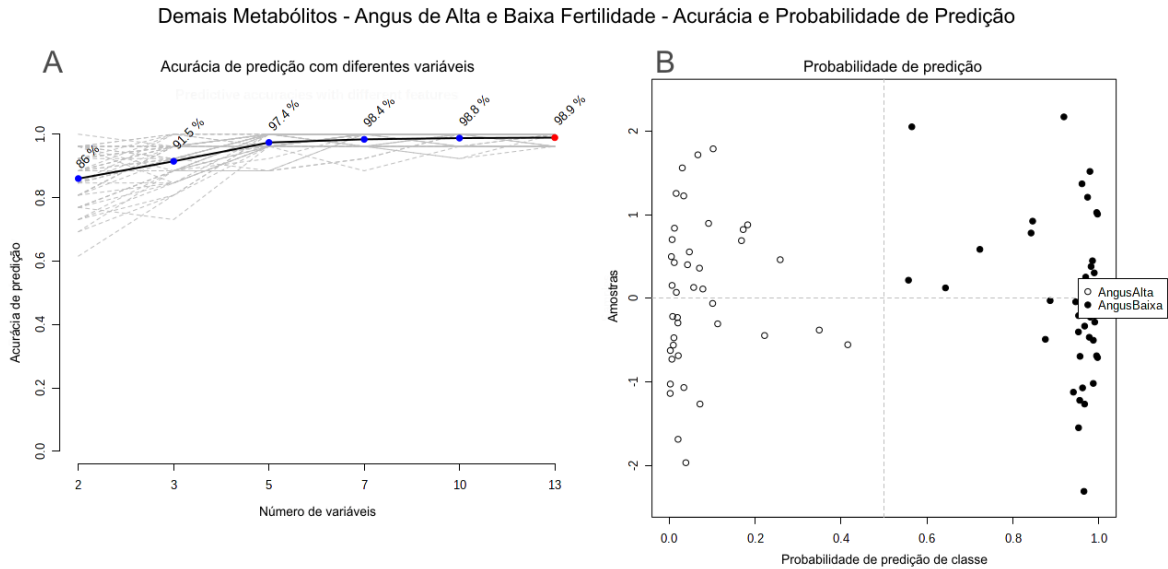
Figura 82 - Curva ROC e *boxplot* de demais metabólitos para ilustrar a acurácia e separação entre os grupos Angus de alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

Análise univariada de curva ROC e *boxplot* de dois dos metabólitos listados na tabela acima. Em A: AMP cíclico, curva ROC com valor de AUC de 0,960 (sensitividade=0,85 e especificidade=0,975) e *boxplot* ilustrando separação de amostras; em B: hipoxantina, curva ROC com valor de AUC de 0,912 (sensitividade=0,825 e especificidade=0,85) e *boxplot* ilustrando separação de amostras.

Figura 83 - Análise multivariada de biomarcadores de demais metabólitos em grupos Angus de alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

Em A: gráfico indicando acurácia de predição com diferentes quantidades de metabólitos para a separação dos grupos. Em B: gráfico resultante do uso do MetaboAnalyst Tester para verificação de biomarcadores; o gráfico apresenta a separação dos grupos com uso de sete metabólitos com maior valor de AUC, com valor de P empírico <0,001.

**Nelore de alta e baixa fertilidade**

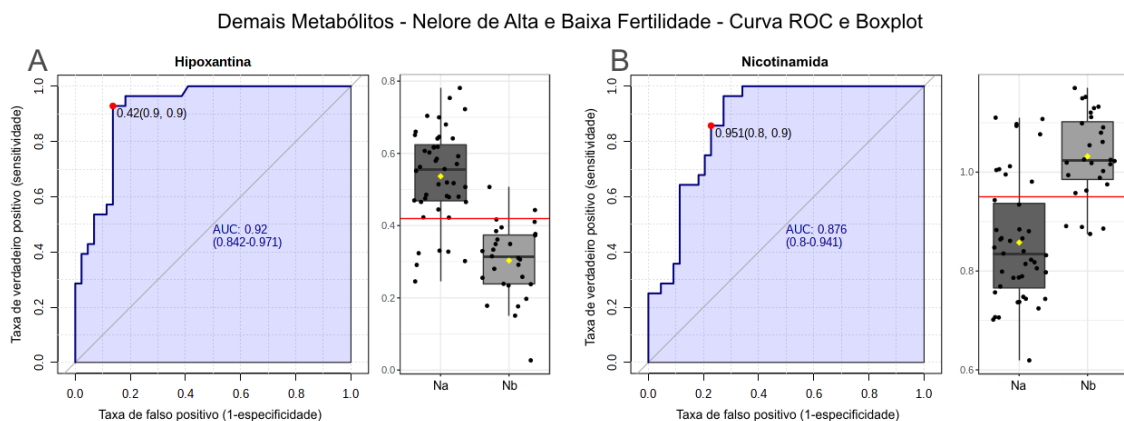
Tabela 40 - Demais metabólitos selecionados com acurácia acima de 0,8 para os grupos Nelore de alta e baixa fertilidade

Metabólitos	AUC	IC (95%)	Sensitividade	Especificidade	P (Teste T)
Hipoxantina	0,91518	0,845-0,971	0,929	0,864	1,22E-11
Nicotinamida	0,87256	0,783-0,944	0,857	0,773	9,87E-09
Inosina	0,85146	0,755-0,929	0,857	0,773	1,12E-07
AMP cíclico	0,80682	0,695-0,896	0,786	0,682	3,85E-07

Fonte: Leite (2022)

Colunas com valor de AUC (área sob a curva ROC, acurácia), intervalo de confiança, sensibilidade, especificidade e P de teste-T (em notação científica).

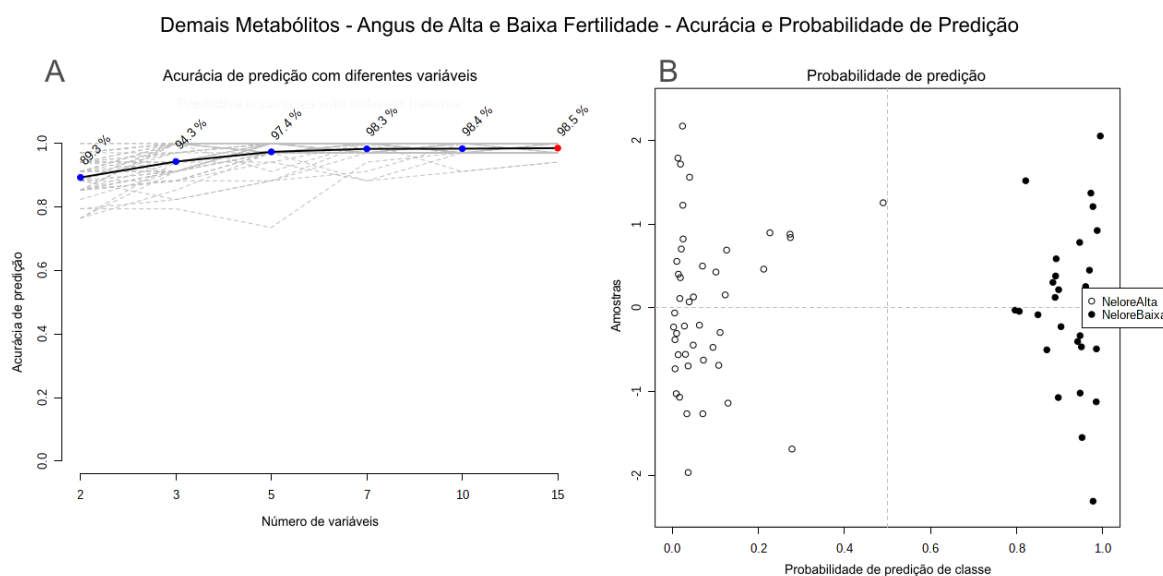
Figura 84 - Curva ROC e *boxplot* de demais metabólitos para ilustrar a acurácia e separação entre os grupos Nelore de alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

Análise univariada de curva ROC e *boxplot* de dois dos metabólitos listados na tabela acima. Em A: hipoxantina, curva ROC com valor de AUC de 0,915 (sensitividade=0,929 e especificidade=0,864) e *boxplot* ilustrando separação de amostras; em B: nicotinamida, curva ROC com valor de AUC de 0,873 (sensitividade=0,857 e especificidade=0,773) e *boxplot* ilustrando separação de amostras.

Figura 85 - Análise multivariada de biomarcadores de demais metabólitos em grupos Nelore de alta e baixa fertilidade



Fonte: Leite (2022)

Em A: gráfico indicando acurácia de predição com diferentes quantidades de metabólitos para a separação dos grupos. Em B: gráfico resultante do uso do MetaboAnalyst Tester para verificação de biomarcadores; o gráfico apresenta a separação dos grupos com uso de dez metabólitos com maior valor de AUC, com valor de  $P$  empírico  $<0,001$ .

### 3.4.4 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO DE DADOS FUNCIONAIS E METABÓLICOS

As análises de correlação foram feitas com dados não transformados pelo teste de Spearman, com classificação por grupo e ranqueamento dos resultados. As análises foram realizadas por grupo (Aa, Ab, Na e Nb), com os dados das variáveis funcionais que apresentaram maior importância nas diferenças dos grupos estudados e variáveis metabólicas selecionadas por meio da PCA e PLSDA (VIP score). Há correlações que não apresentam valores de  $r$  elevados para algumas variáveis, no entanto, a correlação entre os dados funcionais e metabólicos são importantes para uma melhor visão das vias relacionadas com as diferenças observadas nos grupos estudados. Os quadros com os dados completos estão disponíveis no Apêndice 4.

Nas análises funcionais de atividade mitocondrial e potencial de membrana mitocondrial, o grupo Angus de alta fertilidade apresentou maior porcentagem de células com alta atividade mitocondrial (DAB Classe I) e, portanto, maior índice de atividade mitocondrial (IAM), associado a potencial de membrana mitocondrial

(PMM) alto. Neste grupo, as variáveis DAB Classe I e IAM apresentaram correlação positiva com homocisteína ( $r=0,437$   $P=0,0123$ ;  $r=0,355$ ,  $P=0,0461$ , respectivamente) e com a fosfatidilcolina 16:0/18:2 ( $r=0,305$ ,  $P=0,0483$ ;  $r=0,418$ ,  $P=0,0154$ , respectivamente), e correlação inversa com glicina ( $r=-0,343$ ,  $P=0,0736$ ;  $r=-0,480$ ,  $P=0,0097$ , respectivamente). DAB Classe I teve ainda correlação positiva com adenina ( $r=0,334$ ,  $P=0,0353$ ), glutamina ( $r=0,316$ ,  $P=0,0473$ ) e ácidos adenilsuccínico ( $r=0,323$ ,  $P=0,042$ ) e aspártico ( $r=0,328$ ,  $P=0,0389$ ), e correlação inversa com glicina ( $r=-0,343$ ,  $P=0,0736$ ). Foi observado para IAM correlação positiva com creatina ( $r=0,371$ ,  $P=0,0186$ ) e inversa com ácido pirúvico ( $r=-0,365$ ,  $P=0,0205$ ). No grupo (Aa), o PMM alto apresentou correlação positiva com homocisteína ( $r=0,659$ ,  $P<,0001$ ), glutatona oxidada ( $r=0,402$ ,  $P=0,0102$ ), citrulina ( $r=0,396$ ,  $P=0,0115$ ), AMP cíclico ( $r=0,377$ ,  $P=0,0166$ ), ácido isocítrico ( $r=0,361$ ,  $P=0,0223$ ), glutamina ( $r=0,340$ ,  $P=0,0316$ ), GMP ( $r=0,321$ ,  $P=0,0433$ ) e estearoil-L-carnitina ( $r=0,313$ ,  $P=0,049$ ). Nestes resultados se destaca a correlação positiva das três variáveis analisadas com homocisteína, considerando-se ainda que no grupo Angus de baixa fertilidade, foi observada correlação inversa com este aminoácido nas variáveis relacionadas com atividade e potencial de membrana mitocondriais.

As amostras de Angus de baixa fertilidade também apresentaram na análise funcional alta atividade mitocondrial (DAB Classe I e IAM), associada, no entanto, com PMM baixo e médio. Neste grupo, nas variáveis DAB Classe I e IAM houve correlação positiva com ácido cítrico ( $r=0,454$ ,  $P=0,0032$ ;  $r=0,554$ ,  $P=0,0002$ , respectivamente), metionina ( $r=0,429$ ,  $P=0,0058$ ;  $r=0,378$ ,  $P=0,0163$ , respectivamente), treonina ( $r=0,425$ ,  $P=0,0063$ ;  $r=0,455$ ,  $P=0,0032$ , respectivamente), e fosfatidilcolina 16:0/18:2 ( $r=0,367$ ,  $P=0,0197$ ;  $r=0,488$ ,  $P=0,0014$ , respectivamente). As duas variáveis apresentaram, como salientado acima, correlação inversa com homocisteína ( $r=-0,329$ ,  $P=0,0498$ ;  $r=-0,394$ ,  $P=0,0174$ , respectivamente), além do ácido succínico ( $r=-0,353$ ,  $P=0,0257$ ;  $r=-0,334$ ,  $P=0,0354$ ). No IAM houve ainda correlação inversa com hipoxantina ( $r=-0,457$ ,  $P=0,003$ ) e positiva com mononucleotídeo de flavina ( $r=0,351$ ,  $P=0,036$ ) e ácido  $\alpha$ -cetoglutárico ( $r=0,331$ ,  $P=0,0368$ ). Quanto ao PMM médio, o mesmo apresentou correlação positiva com mononucleotídeo de flavina ( $r=0,467$ ,  $P=0,0041$ ), ácido cítrico ( $r=0,449$ ,  $P=0,0036$ ), treonina ( $r=0,418$ ,  $P=0,0072$ ), ácido  $\alpha$ -cetoglutárico ( $r=0,407$ ,  $P=0,0092$ ), prolina ( $r=0,484$ ,  $P=0,0015$ ), adenosina ( $r=0,341$ ,  $P=0,0314$ ) e ácido málico ( $r=0,337$ ,  $P=0,0335$ ) e metionina ( $r=0,343$ ,  $P=0,0302$ ). No grupo Ab, o

PMM médio teve ainda correlação inversa com homocisteína ( $r=-0,376$ ,  $P=0,0236$ ) e AMP cíclico ( $r=-0,368$ ,  $P=0,0196$ ). O PMM baixo, observado em uma maior porcentagem de células das amostras do grupo Ab, apresentou correlação inversa com metionina ( $r=-0,648$ ,  $P<0,0001$ ), nicotinamida ( $r=-0,593$ ,  $P<0,0001$ ), treonina ( $r=-0,543$ ,  $P=0,0003$ ), isoleucina ( $r=-0,472$ ,  $P=0,0021$ ), ácido cítrico ( $r=-0,470$ ,  $P=0,0022$ ), prolina ( $r=-0,462$ ,  $P=0,0027$ ), ácido aspártico ( $r=-0,459$ ,  $P=0,0029$ ), ácido málico ( $r=-0,421$ ,  $P=0,0069$ ), e L-carnitina ( $r=-0,396$ ,  $P=0,0113$ ).

Na raça Nelore, pela variação dos resultados nas classes de atividade mitocondrial, os resultados de correlação relacionados à mesma foram selecionados com o uso da variável índice de atividade mitocondrial (IAM). No grupo Nelore de alta fertilidade houve correlação positiva entre o IAM e acetilcarnitina ( $r=0,553$ ,  $P=0,0001$ ), ácido láctico ( $r=0,537$ ,  $P=0,0002$ ), octanoil-L-carnitina ( $r=0,323$ ,  $P=0,0372$ ) e L-carnitina ( $r=0,322$ ,  $P=0,0377$ ) e inversa com ácido glutâmico ( $r=-0,430$ ,  $P=0,0045$ ) e AMP cíclico ( $r=-0,341$ ,  $P=0,0273$ ). As amostras de Nelore de alta fertilidade apresentaram ainda alto PMM, para o qual houve correlação positiva com DHA ( $r=0,543$ ,  $P=0,0001$ ), esfingomielina d18:1/24:0 ( $r=0,539$ ,  $P=0,0002$ ), creatina ( $r=0,396$ ,  $P=0,0077$ ), isoleucina ( $r=0,360$ ,  $P=0,0163$ ), xantina ( $r=0,323$ ,  $P=0,0417$ ) e ácido aspártico ( $r=0,301$ ,  $P=0,0473$ ), e correlação inversa com glutathione ( $r=-0,415$ ,  $P=0,0051$ ), AMP ( $r=-0,405$ ,  $P=0,0063$ ), guanossina ( $r=-0,311$ ,  $P=0,04$ ) e AMP cíclico ( $r=-0,310$ ,  $P=0,0406$ ). No grupo Nelore de baixa fertilidade, também foi observada correlação positiva entre o IAM e octanoil-L-carnitina ( $r=0,600$ ,  $P=0,0009$ ) e ácido láctico ( $r=0,599$ ,  $P=0,001$ ), além de adenina ( $r=0,575$ ,  $P=0,0017$ ), AMP ( $r=0,559$ ,  $P=0,0024$ ), ácido aspártico ( $r=0,517$ ,  $P=0,0057$ ), ácido pirúvico ( $r=0,458$ ,  $P=0,0163$ ), dimetilglicina ( $r=0,457$ ,  $P=0,0165$ ) e adenosina ( $r=0,438$ ,  $P=0,0222$ ). Neste grupo, o IAM apresentou correlação inversa com os ácidos adenilsuccínico ( $r=-0,549$ ,  $P=0,003$ ) e málico ( $r=-0,443$ ,  $P=0,0207$ ).

Quanto ao *status* oxidativo, foram selecionados os resultados de correlação de presença de EROs e suscetibilidade à peroxidação lipídica (TBARS) com os metabólitos. No grupo Angus de alta fertilidade, que apresentou menor presença de EROs que o grupo de baixa fertilidade e mais que os grupos da raça Nelore, houve correlação positiva entre EROs e L-Carnitina ( $r=0,311$ ,  $P=0,0476$ ) e ácido pirúvico ( $r=0,305$ ,  $P=0,0428$ ), e correlação inversa com a esfingomielina d18:1/24:0 ( $r=-0,430$ ,  $P=0,01$ ) e o mediador lipídico lisoPAF ( $r=-0,416$ ,  $P=0,0094$ ). O grupo Aa também apresentou menor suscetibilidade à peroxidação lipídica em comparação

com o grupo Ab e houve correlação positiva entre TBARS e alanina ( $r=0,506$ ,  $P=0,0009$ ), fosfatidilcolina 16:1(9Z)/16:1(9Z) ( $r=0,468$ ,  $P=0,0023$ ), esfingomiéline d18:1/18:0 ( $r=0,418$ ,  $P=0,0101$ ) e metionina ( $r=0,362$ ,  $P=0,0219$ ), e correlação inversa com palmitoil-L-carnitina ( $r=-0,502$ ,  $P=0,001$ ), glutatona oxidada ( $r=-0,458$ ,  $P=0,003$ ), L-Carnitina ( $r=-0,384$ ,  $P=0,0145$ ), ácido láctico ( $r=-0,344$ ,  $P=0,0299$ ), colina ( $r=-0,338$ ,  $P=0,0331$ ), ácido cítrico ( $r=-0,337$ ,  $P=0,0336$ ) e estearoil-L-carnitina ( $r=-0,336$ ,  $P=0,0339$ ). Quanto ao grupo Angus de baixa fertilidade, com maior presença de EROs em comparação com os demais grupos, houve correlação positiva entre EROs e acetilcarnitina ( $r=0,508$ ,  $P=0,001$ ), ácidos aspártico ( $r=0,409$ ,  $P=0,0097$ ) e adenilsuccínico ( $r=0,392$ ,  $P=0,0135$ ), e correlação inversa com a fosfatidilcolina 16:0/18:2 ( $r=-0,368$ ,  $P=0,021$ ). Com maior suscetibilidade à peroxidação lipídica em comparação com os demais grupos, o grupo Ab, ao contrário do observado no grupo Aa, apresentou correlação positiva entre TBARS e homocisteína ( $r=-0,715$ ,  $P<,0001$ ), ácido láctico ( $r=0,594$ ,  $P<,0001$ ), ácido cítrico ( $r=0,592$ ,  $P<,0001$ ) e glutatona oxidada ( $r=0,479$ ,  $P=0,002$ ), como também com mononucleotídeo de flavina ( $r=0,593$ ,  $P=0,0002$ ), ácido isocítrico ( $r=0,559$ ,  $P=0,0002$ ) e adenina ( $r=0,509$ ,  $P=0,0009$ ). No mesmo grupo, a variável apresentou ainda correlação inversa com hipoxantina ( $r=-0,646$ ,  $P<,0001$ ), glutamina ( $r=-0,469$ ,  $P=0,0026$ ), citrulina ( $r=-0,405$ ,  $P=0,0105$ ) e AMP ( $r=-0,400$ ,  $P=0,0115$ ).

O grupo Nelore de alta fertilidade, com menor presença de EROs que os demais grupos, apresentou correlação positiva desta variável com mononucleotídeo de flavina ( $r=0,445$ ,  $P=0,004$ ), ácido láctico ( $r=0,411$ ,  $P=0,0056$ ), GMP ( $r=0,368$ ,  $P=0,0141$ ) e ácido pirúvico ( $r=0,328$ ,  $P=0,0298$ ), e correlação inversa com DHA ( $r=-0,361$ ,  $P=0,0161$ ), fosfatidilcolina 20:4/16:0 ( $r=-0,327$ ,  $P=0,0321$ ), tirosina ( $r=-0,318$ ,  $P=0,0357$ ), octanoil-L-carnitina ( $r=-0,354$ ,  $P=0,0183$ ) e lisoPAF ( $r=-0,299$ ,  $P=0,0488$ ). O grupo Na apresentou maior suscetibilidade à peroxidação lipídica que o Nb, com correlação positiva entre TBARS e xantina ( $r=0,490$ ,  $P=0,0013$ ) e inversa com ácido  $\alpha$ -cetoglúterico ( $r=-0,611$ ,  $P<,0001$ ), fosfatidilcolina 18:0/20:4 ( $r=-0,555$ ,  $P<,0001$ ), os ácidos isocítrico ( $r=-0,520$ ,  $P=0,0003$ ), pantotênico ( $r=-0,515$ ,  $P=0,0003$ ), láctico ( $r=-0,430$ ,  $P=0,0036$ ) e pirúvico ( $r=-0,425$ ,  $P=0,0041$ ), fosfatidilcolina 16:1(9Z)/16:1(9Z) ( $r=-0,419$ ,  $P=0,0071$ ), inosina ( $r=-0,416$ ,  $P=0,005$ ), fosfatidilcolina 16:0/18:2 ( $r=-0,404$ ,  $P=0,0066$ ) e lisoPAF ( $r=-0,336$ ,  $P=0,0257$ ). No grupo Nelore de baixa fertilidade, que nos resultados funcionais este apresentou menos EROs que a raça Angus e menor suscetibilidade à peroxidação lipídica tanto em comparação com

Angus quanto com o grupo Nelore de alta fertilidade, houve correlação positiva entre EROs e estearoil-L-carnitina ( $r=0,541$ ,  $P=0,0029$ ), acetilcarnitina ( $r=0,516$ ,  $P=0,005$ ), ácidos cítrico ( $r=0,525$ ,  $P=0,0041$ ), láctico ( $r=0,453$ ,  $P=0,0154$ ), pirúvico ( $r=0,423$ ,  $P=0,0249$ ), pantotênico ( $r=0,395$ ,  $P=0,0377$ ), glutâmico ( $r=0,452$ ,  $P=0,0157$ ) e alanina ( $r=0,440$ ,  $P=0,0191$ ), e correlação inversa com a fosfatidilcolina 18:0/20:4 ( $r=0,502$ ,  $P=0,0065$ ). Para o TBARS, o grupo apresentou correlação positiva com valina ( $r=0,711$ ,  $P<0,0001$ ), tirosina ( $r=0,637$ ,  $P=0,0003$ ), adenina ( $r=0,433$ ,  $P=0,0213$ ), leucina ( $r=0,579$ ,  $P=0,0012$ ), ácidos aspártico ( $r=0,605$ ,  $P=0,0007$ ), glutâmico ( $r=0,573$ ,  $P=0,0014$ ), láctico ( $r=0,666$ ,  $P=0,0001$ ),  $\alpha$ -cetoglutárico ( $r=0,524$ ,  $P=0,0042$ ) e succínico ( $r=0,455$ ,  $P=0,015$ ), e correlação inversa com a lisofosfatidilcolina 18:1 ( $r=-0,490$ ,  $P=0,0081$ ) e com o ácido málico ( $r=-0,432$ ,  $P=0,0217$ ).

Quanto à integridade de membrana plasmática, os animais de alta fertilidade apresentaram maior integridade. No grupo Angus de alta fertilidade, a integridade de membrana plasmática apresentou correlação positiva com adenina ( $r=0,599$ ,  $P<0,0001$ ), fosfatidilcolina 16:0/18:2 ( $r=0,564$ ,  $P=0,0001$ ), adenosina ( $r=0,491$ ,  $P=0,0013$ ), propionil-L-carnitina ( $r=0,371$ ,  $P=0,0185$ ), estearoil-L-carnitina ( $r=0,337$ ,  $P=0,0335$ ), palmitoil-L-carnitina ( $r=0,313$ ,  $P=0,0489$ ), e correlação inversa com os ácidos aspártico ( $r=-0,654$ ,  $P<0,0001$ ), pirúvico ( $r=-0,363$ ,  $P=0,0212$ ) e glicina ( $r=-0,411$ ,  $P=0,03$ ). Para o grupo Nelore de alta fertilidade houve correlação positiva entre integridade de membrana plasmática e acetilcarnitina ( $r=0,352$ ,  $P=0,0193$ ) e octanoil-L-carnitina ( $r=0,314$ ,  $P=0,0377$ ), e correlação inversa com ácidos isocítrico ( $r=-0,352$ ,  $P=0,0192$ ), pantotênico ( $r=-0,319$ ,  $P=0,0351$ ), succínico ( $r=-0,309$ ,  $P=0,0415$ ) glutâmico ( $r=-0,307$ ,  $P=0,0428$ ), e AMP cíclico ( $r=-0,316$ ,  $P=0,0368$ ). Nestes dois grupos, portanto, se observou, para esta variável funcional, correlação positiva com carnitinas e inversa com ácidos orgânicos e aminoácidos. Entre os grupos de baixa fertilidade, com menor porcentagem de células com integridade de membrana plasmática, o grupo da raça Angus apresentou correlação positiva com treonina ( $r=0,646$ ,  $P<0,0001$ ), ácido cítrico ( $r=0,616$ ,  $P<0,0001$ ), prolina ( $r=0,523$ ,  $P=0,0005$ ), ácido pantotênico ( $r=0,444$ ,  $P=0,0041$ ), ácido aspártico ( $r=0,435$ ,  $P=0,0005$ ), isoleucina ( $r=0,434$ ,  $P=0,0052$ ), fosfatidilcolina 20:4/16:0 ( $r=0,432$ ,  $P=0,0054$ ), alanina ( $r=0,423$ ,  $P=0,0065$ ) e metionina ( $r=0,393$ ,  $P=0,0121$ ), e correlação inversa apenas com homocisteína ( $r=-0,486$ ,  $P=0,0026$ ). Por fim, o grupo Nelore de baixa fertilidade teve correlação positiva entre integridade de membrana



plasmática com lisoPAF ( $r=0,519$ ,  $P=0,0055$ ) e L-Carnitina ( $r=0,519$ ,  $P=0,0055$ ), e correlação inversa com ácidos isocítrico ( $r=-0,592$ ,  $P=0,0011$ ), adenilsuccínico ( $r=-0,466$ ,  $P=0,0143$ ) e TMP ( $r=-0,418$ ,  $P=0,0302$ ).

Em relação à integridade de membrana acrossomal, variável em que houve diferença apenas entre os animais de baixa fertilidade, no grupo Angus de alta fertilidade houve correlação positiva com fosfatidilcolina 16:0/18:2 ( $r=0,577$ ,  $P<,0001$ ), GMP ( $r=0,442$ ,  $P=0,0043$ ), homocisteína ( $r=0,421$ ,  $P=0,0164$ ), glutamina ( $r=0,390$ ,  $P=0,0127$ ), propionil-L-carnitina ( $r=0,387$ ,  $P=0,0136$ ), estearoil-L-carnitina ( $r=0,375$ ,  $P=0,0171$ ), creatina ( $r=0,367$ ,  $P=0,0199$ ), e correlação inversa com metionina ( $r=-0,505$ ,  $P=0,0009$ ), ácido pirúvico ( $r=-0,442$ ,  $P=0,0043$ ), ácido aspártico ( $r=-0,359$ ,  $P=0,0228$ ), e FMN ( $r=-0,352$ ,  $P=0,0481$ ). No grupo Nelore de alta fertilidade, houve correlação positiva entre integridade de membrana acrossomal e octanoil-L-carnitina ( $r=0,569$ ,  $P<,0001$ ), GMP ( $r=0,484$ ,  $P=0,0009$ ), mononucleotídeo de flavina ( $r=0,422$ ,  $P=0,0066$ ), acetilcarnitina ( $r=0,390$ ,  $P=0,0088$ ), AMP ( $r=0,362$ ,  $P=0,0156$ ), ácidos láctico ( $r=0,336$ ,  $P=0,0256$ ) e  $\gamma$ -aminobutírico ( $r=0,315$ ,  $P=0,037$ ), e correlação inversa com DHA ( $r=-0,357$ ,  $P=0,0173$ ), isoleucina ( $r=-0,356$ ,  $P=0,0178$ ) e ácido succínico ( $r=-0,348$ ,  $P=0,0206$ ). Entre os grupos de baixa fertilidade, o grupo da raça Angus apresentou maior integridade de membrana acrossomal e correlação positiva desta com ácido cítrico ( $r=0,623$ ,  $P<,0001$ ), prolina ( $r=0,517$ ,  $P=0,0006$ ), ácido isocítrico ( $r=0,515$ ,  $P=0,0007$ ), ácido glutâmico ( $r=0,480$ ,  $P=0,0017$ ), mononucleotídeo de flavina ( $r=0,460$ ,  $P=0,0048$ ), ácido pantotênico ( $r=0,415$ ,  $P=0,0077$ ), glutationa oxidada ( $r=0,415$ ,  $P=0,0078$ ) e adenina ( $r=0,413$ ,  $P=0,0081$ ), e correlação inversa com homocisteína ( $r=-0,480$ ,  $P=0,0031$ ) e AMP cíclico ( $r=-0,396$ ,  $P=0,0114$ ). Com menor integridade de membrana acrossomal, o grupo Nelore de baixa fertilidade teve correlação positiva desta variável com lisoPAF ( $r=0,454$ ,  $P=0,0174$ ) e fosfatidilcolina 16:0/14:0 ( $r=0,443$ ,  $P=0,0207$ ), e correlação inversa com ácido adenilsuccínico ( $r=-0,429$ ,  $P=0,0255$ ).

Na análise de suscetibilidade à fragmentação de DNA, os resultados mostram menor suscetibilidade na raça Angus em comparação com a Nelore, e entre os Angus, houve menor suscetibilidade no grupo de alta fertilidade. Neste grupo houve correlação positiva entre suscetibilidade à fragmentação de DNA e xantina ( $r=0,425$ ,  $P=0,0098$ ) e ácido aspártico ( $r=0,355$ ,  $P=0,0246$ ), e correlação inversa com inosina ( $r=-0,441$ ,  $P=0,0071$ ), adenina ( $r=-0,400$ ,  $P=0,0105$ ), adenosina ( $r=-0,324$ ,  $P=0,0417$ ), glutationa ( $r=-0,326$ ,  $P=0,04$ ) e palmitoil carnitina ( $r=-0,310$ ,  $P=0,0413$ ).

No grupo Angus de baixa fertilidade, foi observada correlação positiva com ácido cítrico ( $r=0,622$ ,  $P<,0001$ ), glutathiona oxidada ( $r=0,502$ ,  $P=0,001$ ), homocisteína ( $r=-0,481$ ,  $P=0,00$ ), ácido isocítrico ( $r=0,444$ ,  $P=0,0041$ ), mononucleotídeo de flavina ( $r=0,435$ ,  $P=0,008$ ), treonina ( $r=0,422$ ,  $P=0,0067$ ), adenina ( $r=0,370$ ,  $P=0,0189$ ), ácidos glutâmico ( $r=0,364$ ,  $P=0,021$ ) e aspártico ( $r=0,343$ ,  $P=0,0301$ ), e correlação inversa com hipoxantina ( $r=-0,552$ ,  $P=0,0002$ ) e AMP ( $r=-0,316$ ,  $P=0,0472$ ). Apesar de haver maior suscetibilidade à fragmentação de DNA na raça Nelore, não houve diferença entre os grupos de alta e baixa fertilidade. No grupo de alta fertilidade houve correlação positiva entre suscetibilidade à fragmentação de DNA e DHA ( $r=0,461$ ,  $P=0,0016$ ), tirosina ( $r=0,421$ ,  $P=0,0044$ ), TMP ( $r=0,393$ ,  $P=0,0082$ ), ácido pantotênico ( $r=0,370$ ,  $P=0,0135$ ), isoleucina ( $r=0,369$ ,  $P=0,0138$ ) e ácido glutâmico ( $r=0,368$ ,  $P=0,014$ ), e correlação inversa com colina ( $r=-0,465$ ,  $P=0,0015$ ), GMP ( $r=-0,430$ ,  $P=0,0036$ ), octanoil-L-carnitina ( $r=-0,426$ ,  $P=0,004$ ), AMP ( $r=-0,402$ ,  $P=0,0068$ ) e acetilcarnitina ( $r=-0,392$ ,  $P=0,0086$ ). Enquanto o grupo Nelore de baixa fertilidade apresentou apenas correlações inversas, com ácido láctico ( $r=-0,754$ ,  $P<,0001$ ), valina ( $r=-0,664$ ,  $P=0,0001$ ), esfingomielina d18:1/16:0 ( $r=-0,619$ ,  $P=0,0004$ ), lisofosfatidilcolina 18:1 ( $r=-0,573$ ,  $P=0,0014$ ), adenina ( $r=-0,572$ ,  $P=0,0015$ ), leucina ( $r=-0,562$ ,  $P=0,0018$ ), adenosina ( $r=-0,516$ ,  $P=0,005$ ), alanina ( $r=-0,503$ ,  $P=0,0064$ ), ácido aspártico ( $r=-0,500$ ,  $P=0,0068$ ), estearoil-L-carnitina ( $r=-0,474$ ,  $P=0,0108$ ) e fosfatidilcolina 16:0/14:0 ( $r=-0,471$ ,  $P=0,0115$ ).

### 3.4.5 DISCUSSÃO

A identificação precoce de touros com alta ou baixa fertilidade, ou seja, antes que os mesmos entrem em serviço, representa, sem dúvida, um grande avanço para ampliar a produtividade e, conseqüentemente, a produção na pecuária com sustentabilidade e redução de custos. Os resultados apresentados no primeiro experimento deste estudo, corroborados por outros estudos com bovinos e demais espécies de mamíferos, deixam claro que os processos relacionados à fisiologia da fertilidade do macho são multifatoriais. Portanto, a associação e correlação de resultados de análises funcionais e metabólicas podem contribuir para uma maior compreensão das vias envolvidas e seu impacto no perfil de fertilidade (AITKEN, 2006; GADELLA, 2008; WANG e SWERDLOFF, 2014; ALVES, ARRUDA, *et al.*, 2017; MENEZES, VELHO, *et al.*, 2019; SHAN, XU, *et al.*, 2021). Os resultados das análises funcionais apresentados demonstram que os animais de baixa fertilidade

apresentam uma maior porcentagem de células com problemas no metabolismo energético, com alterações na função mitocondrial resultando em estresse oxidativo e danos às estruturas espermáticas fundamentais para o processo de fertilização. Com as análises realizadas no segundo experimento, o objetivo deste capítulo é associar os resultados metabólicos observados com os funcionais.

Apesar do perfil lipídico fazer parte do metaboloma, o mesmo foi destacado neste estudo devido à importância da membrana plasmática em vários eventos fisiológicos do espermatozoide, os quais interferem em seu potencial fertilizante. Desta forma e, considerando-se ainda a extensão de metabólitos avaliados, a discussão foi dividida em dois tópicos, perfil lipídico e perfil metabólico.

### **Perfil lipídico**

O papel dos lipídios na fertilidade vem recebendo cada vez mais atenção, com a publicação de artigos associando a fertilidade com o perfil lipídico de espermatozoides em várias espécies de mamíferos, especialmente em humanos. Estes avaliam o papel das diferentes classes lipídicas na membrana plasmática e buscam por potenciais biomarcadores de padrões de fertilidade. Essencial para a sua viabilidade e para que o espermatozoide cumpra a função de fertilização do oócito, a composição lipídica das membranas plasmática e acrossomal é complexa e heterogênea, abrangendo diferentes classes lipídicas, como lipídios neutros (colesterol e diacilgliceróis), ácidos graxos (ácidos docosahexaenóico, araquidônico, linoléico, oleico, esteárico, palmítico, palmitoléico, heptadecenóico e mirístico), glicolipídios, esfingosinas e fosfolipídios (fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, fosfatidilserinas, fosfatidilinositois e esfingomielinas) (PARKS e LYNCH, 1992; WASSALL e STILLWELL, 2009; SHAN, XU, *et al.*, 2021). É importante salientar, que devido à perda da maior parte das organelas celulares e pela ausência de transcrição de DNA, as células espermáticas não possuem a habilidade de sintetizar novos componentes lipídicos para as suas membranas (FLESH e GADELLA, 2000).

Apesar da análise de espectrometria de massas pelo método target, utilizada neste estudo, não ter detectado representantes de todas as classes lipídicas, os resultados obtidos demonstram diferenças importantes entre os grupos estudados. Na classe de lipídios neutros, o colesterol é o mais abundante em espermatozoides e mais efetivo que os diacilgliceróis nas ações de manutenção da estabilidade, fluidez e estrutura de microdomínios da membrana (ALWARAWRAH, DAI e HUANG,

2012; LEAHY e GADELLA, 2015), além de ser fundamental no processo de capacitação espermática (CROSS, 1998; GADELLA, TSAI, *et al.*, 2008). Não obstante os resultados entre os grupos de alta fertilidade indicarem maior quantidade de colesterol na raça Nelore, o resultado que se destaca é a quantidade deste esterol no grupo Angus de baixa fertilidade. A concentração de colesterol neste grupo supera a observada nos demais, com uma diferença de mais de 1000 ng/mL em comparação com o grupo Angus de alta fertilidade e de mais de 800 ng/mL em relação ao grupo Nelore de baixa fertilidade. Além disso, na análise de componentes principais na raça Angus, o colesterol apresenta grande influência na separação dos grupos. A maior concentração de colesterol observada no grupo Angus de baixa fertilidade pode estar relacionada a uma sinalização precoce dos processos de capacitação e reação acrossomal, inicializada pelo efluxo de colesterol da membrana plasmática (CROSS, 1998; GADELLA, TSAI, *et al.*, 2008; JAGAN MOHANARAO e ATREJA, 2011; AITKEN, 2017). Esta possibilidade pode ser corroborada pelos resultados de cinética espermática observados no grupo, como a maior amplitude do movimento lateral da cabeça, maior frequência de batimento de flagelo e menor linearidade de movimento, características que, apesar da necessidade de mais estudos relacionando cinética e fertilidade, podem ser indicativas de capacitação precoce ou criocapacitação (SHOJAEI, KROETSCH, *et al.*, 2012; ANDRADE, MOREIRA, *et al.*, 2018).

O maior efluxo de colesterol pode estar relacionado ainda a danos na integridade da membrana causados, por exemplo, pelo estresse oxidativo, sendo que o grupo Angus de baixa fertilidade apresentou uma maior porcentagem de células tanto com menor integridade de membrana, quanto com maior presença de EROs e suscetibilidade à peroxidação lipídica (MANDAL, BADIYAKAR e CHAKRABARTY, 2014; KUMAR, PRASAD, *et al.*, 2019). É importante salientar, que a sinalização precoce da capacitação com o efluxo de colesterol, resulta em alteração da fluidez, atividade biológica de proteínas e na proporção colesterol/fosfolipídios da membrana, culminando com uma menor viabilidade da capacidade fecundante do espermatozoide (TRAVIS e KOPF, 2002). Os resultados também mostram que, na comparação entre os grupos da raça Angus, além de maior concentração de colesterol, o grupo de baixa fertilidade possui menor concentração de fosfolipídios. Há estudos com espermatozoides humanos que associam a alta concentração de colesterol e a razão entre esta e a concentração de

fosfolipídios, com infertilidade (SUGKRAROEK, KATES, *et al.*, 1991; CROSS, 1998; GAROLLA, ŠABOVIĆ, *et al.*, 2018).

Entre os fosfolipídios, a classe mais abundante nas células espermáticas de mamíferos é a de fosfatidilcolinas (PC), as quais possuem funções fundamentais na preservação da estrutura dinâmica da membrana espermática, bem como de sinalização para alterações, por exemplo, relacionadas à reação acrossomal e fusão de membranas no processo de fecundação (CROSS, 2000; GADELLA, TSAI, *et al.*, 2008; VELHO, MENEZES, *et al.*, 2018; SHAN, XU, *et al.*, 2021). Entre as fosfatidilcolinas detectadas neste estudo, o grupo Angus de alta fertilidade apresentou maior concentração em todas em comparação com o grupo de baixa fertilidade. A importância desta diferença observada na raça Angus é corroborada com a presença de cinco fosfatidilcolinas entre os maiores resultados de VIP score, as quais tiveram grande peso na variância e separação dos grupos de alta e baixa fertilidade. Entre estas, a PC (16:0/18:2(9Z,12Z)), além de ter uma concentração maior no grupo de alta fertilidade, apresenta, no mesmo, correlação positiva com alta atividade mitocondrial e integridade de membranas plasmática e acrossomal. Em contrapartida, no grupo Angus de baixa fertilidade houve correlação inversa entre esta PC e presença de EROs. Apesar do grupo Nelore de baixa fertilidade também apresentar correlação inversa entre PC e presença de EROs, não foram observadas diferenças tão significativas na concentração de fosfatidilcolinas na raça Nelore, a qual também teve menor presença de EROs.

Os resultados observados no grupo Angus de baixa fertilidade, no entanto, podem ter origem em um quadro de estresse oxidativo e consequente peroxidação lipídica, resultando em danos às moléculas de PC e consequentemente danos estruturais na membrana plasmática, principalmente considerando-se que estas moléculas são esterificadas a dois ácidos graxos, normalmente PUFAs de cadeia longa (AITKEN, 2017; CRAIG, BRUSH, *et al.*, 2019; EVANS, DINH, *et al.*, 2020). Além disso, como citado acima, a menor concentração de PC corrobora a possibilidade de perda da assimetria de distribuição de fosfolipídios na bicamada lipídica e efluxo de colesterol, mecanismos associados à capacitação e reação acrossomal (ALWARAWRAH, DAI e HUANG, 2012; VAQUER, SUHAIMAN, *et al.*, 2020; SHAN, XU, *et al.*, 2021). Por fim, outra possibilidade é que a redução de fosfatidilcolinas pode ter sido causada pela ação de fosfolipases e sua hidrólise. Este mecanismo resulta na formação de lisofosfatidilcolina (LPC) e um ácido graxo livre, o

qual pode ser carregado para as mitocôndrias e utilizado no metabolismo oxidativo e produção de energia (ALIABADI, MEHRANJANI, *et al.*, 2012; EVANS, DINH, *et al.*, 2020). É relevante notar que, independentemente da causa da menor concentração observada, além de ser o principal componente estrutural das membranas, as fosfatidilcolinas são fontes importantes de moléculas sinalizadoras, como diacilgliceróis (DAG) e lisofosfatidilcolinas (LPC). Alterações nos processos de sinalização gerados pela PC podem afetar outras estruturas da célula espermática e, até mesmo, iniciar o processo de apoptose (SUGKRAROEK, KATES, *et al.*, 1991; FLESH e GADELLA, 2000; CUIA e HOUWELING, 2002).

Como citado acima, fosfatidilcolinas são fontes de moléculas sinalizadoras e importantes mediadores lipídicos, como as lisofosfatidilcolinas. Estas, por carregarem apenas uma cadeia de ácidos graxos, podem deixar a membrana e alcançar seus receptores. Em espermatozoides, este mecanismo de sinalização por meio de LPC está relacionado com alterações no padrão cinético e processos de hiperativação, capacitação e reação acrossomal (BAILEY, BILODEAU e CORMIER, 2000; MURASE, EL-KON, *et al.*, 2010; LONGOBARDI, KOSIOR, *et al.*, 2020). Na análise de lisofosfatidilcolinas, os resultados mostram, nos grupos de alta fertilidade, uma maior concentração das mesmas na raça Angus. No entanto, na comparação entre padrões de fertilidade nas duas raças, foi observada maior concentração de LPC nos animais de alta fertilidade. Os resultados das análises multivariadas também incluem LPC entre os lipídios com maior VIP score e influência na separação dos grupos de alta e baixa fertilidade em Angus e Nelore. Além da diferença de concentração, na raça Angus houve correlação positiva de LPC (18:1) com índice de atividade mitocondrial no grupo de alta fertilidade e correlação inversa da mesma com potencial de membrana mitocondrial baixo no grupo de baixa fertilidade. Quanto à raça Nelore, houve no grupo de baixa fertilidade correlação inversa da mesma LPC com suscetibilidade à peroxidação lipídica e à fragmentação de DNA.

Entre os lisofosfolipídios detectados neste estudo, o Liso-PAF C-16 se distingue das LPCs por ser originado pela hidrólise do fator ativador de plaquetas (PAF). Liso-PAF são moléculas que também influenciam o padrão cinético das células espermáticas, possuem papel importante na modulação de cadeias de ácidos graxos e, como outros lisofosfolipídios, atuam na sinalização nos processos de capacitação e reação acrossomal (ROUDEBUSH, 2001; WU, GAO, *et al.*, 2020; HAILAT, SANNI, *et al.*, 2021). Como observado nos demais lisofosfolipídios, houve

maior presença de Liso-PAF C-16, importante modulador na cadeia do ácido araquidônico (KIM, CHEN J, *et al.*, 2021), nas amostras de animais de alta fertilidade. Entre os grupos de baixa fertilidade, foi observada ainda uma concentração menor em Angus em comparação com Nelore. Além da maior quantidade detectada, vale notar que os resultados de correlação indicam correlação inversa entre Liso-PAF C-16 e presença de EROs nos grupos de alta fertilidade e, no grupo Nelore de baixa fertilidade, correlação positiva com integridade de membranas plasmática e acrossomal. É possível que a menor concentração de liso-PAF e LPC observada nos animais de baixa fertilidade esteja relacionada com alterações no metabolismo energético, peroxidação lipídica e menor integridade de membranas.

Em relação à maior concentração de liso-PAF e LPC nos grupos de alta fertilidade, apesar de existirem estudos que correlacionam a maior concentração dos mesmos, especialmente liso-PAF, com subfertilidade em touros e humanos, os mesmos foram realizados apenas em plasma seminal e levantam incertezas pelo número amostral reduzido (LONGOBARDI, KOSIOR, *et al.*, 2020; WU, GAO, *et al.*, 2020). Os resultados aqui apresentados, por outro lado, são corroborados com os obtidos nas análises funcionais, sem efeitos deletérios da presença excessiva de EROs e com a manutenção das estruturas das células espermáticas nos grupos de alta fertilidade. Há ainda estudos que demonstram a necessidade de um nível de lisofosfolípidios, apesar de não apresentarem quantificação, para as funções fisiológicas normais das células espermáticas, no entanto, a produção e reciclagem destas moléculas devem ser mantidas em equilíbrio para evitar a instabilidade da célula e a tornar inviável (ODEH, DASCANIO, *et al.*, 2003; SHAN, XU, *et al.*, 2020).

Ainda na classe de fosfolípidios, seis esfingomielinas (SM) foram detectadas nos grupos estudados. Em espermatozoides, essa classe lipídica possui papel importante na estrutura da membrana plasmática, principalmente por sua afinidade com o colesterol. Entre as SM analisadas, a palmitoil SM (d18:1/18:1(9Z)) foi detectada apenas nos grupos de alta fertilidade e com maior concentração na raça Angus. Quanto às demais SM detectadas, houve maior concentração nos grupos de alta fertilidade das duas raças, nos quais foi observada ainda correlação positiva entre a palmitoil esfingomielina (d18:1/16:0) e potencial de membrana mitocondrial alto. Vale salientar que nas análises multivariadas de lipídios, as SM estão entre as variáveis importantes na separação dos grupos de alta e baixa fertilidade. Os

resultados observados são importantes, considerando-se os estudos que associam o papel das esfingomielinas com o controle da homeostase do colesterol, da distribuição de proteínas que possuem ação sobre o efluxo de colesterol, na manutenção da estrutura e fluidez da membrana e efeito sobre a motilidade, pela ligação destas com PUFA's de cadeia longa e muito longa (CROSS, 2000; MULLER, MULLER, *et al.*, 2008; LEAHY e GADELLA, 2015; CRAIG, BRUSH, *et al.*, 2019; AHUMADA-GUTIERREZ, PEÑALVA, *et al.*, 2019). Há estudos que demonstram a ocorrência de um grande processo de hidrólise de SM em ceramidas, pela ação de esfingomielinases durante a capacitação e reação acrossomal (FLESH e GADELLA, 2000; LEAHY e GADELLA, 2015; VAQUER, SUHAIMAN, *et al.*, 2020; SHAN, XU, *et al.*, 2021). Com a possibilidade, segundo os resultados observados, do grupo Angus de baixa fertilidade possuir uma maior porcentagem de células em processo de capacitação, talvez a hidrólise de esfingomielinas possa responder pela menor concentração das mesmas observadas no grupo.

Outra classe lipídica importante e abundante nas membranas plasmáticas de espermatozoides, os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) estão presentes em sua maioria esterificados em fosfolipídios. Apesar de a sua presença aumentar os efeitos nocivos do estresse oxidativo, como a peroxidação lipídica (NICHI, GOOVAERTS, *et al.*, 2007; AITKEN e DREVET, 2020), os PUFAs são essenciais para a fluidez de membrana das células espermáticas, estão associados à maior motilidade, conferem proteção durante o processo de criopreservação e atuam no processo de reação acrossomal (WASSALL e STILLWELL, 2009; MARTÍNEZ-SOTO, LANDERAS e GADEA, 2013; MANDAL, BADIYAKAR e CHAKRABARTY, 2014). Entre estes, o ácido docosahexaenóico (DHA) é um dos mais abundantes, mais longos e insaturados (22 carbonos e seis ligações duplas). Os resultados mostram maior concentração de DHA nos animais de alta fertilidade, o que pode atestar a contribuição deste PUFA para a viabilidade espermática. Foi observada também maior concentração de DHA na raça Nelore, em comparação com Angus e, apesar do grupo Nelore de alta fertilidade ter apresentado maior suscetibilidade à peroxidação lipídica pelo teste induzido, o mesmo teve baixa presença de EROs e maior integridade de membrana. As análises de correlação entre dados funcionais e metabólicos neste grupo, também são indicativas da ausência de efeitos deletérios da peroxidação lipídica, pois houve correlação inversa de DHA com presença de EROs e positiva com potencial de membrana mitocondrial alto. De fato, os



benefícios da maior concentração de DHA como mecanismo de proteção e manutenção da viabilidade de espermatozoides de touros no processo de criopreservação foram avaliados por meio de estudos realizados com a suplementação de DHA em diluidores (NASIRI, TOWHIDI e ZEINOALDINI, 2012; LOSANO, ANGRIMANI, *et al.*, 2018; EVANS, DINH, *et al.*, 2020).

As diferenças observadas na concentração das classes lipídicas detectadas neste estudo demonstram claramente uma diferença entre as raças, com as amostras dos touros Angus de alta fertilidade apresentando uma concentração maior de lipídios em comparação com as dos touros da raça Nelore. Apesar desta diferença entre raças, os grupos de alta fertilidade possuem maior equilíbrio na concentração de todas as classes avaliadas, o qual é fundamental para a integridade de membrana plasmática, manutenção do metabolismo energético e homeostase oxidativa, resultando na maior viabilidade das células espermáticas (EVANS, DINH, *et al.*, 2020; SHAN, XU, *et al.*, 2021). Por outro lado, os resultados obtidos nos grupos de baixa fertilidade podem ser indicativos de instabilidade na estrutura da membrana plasmática dos espermatozoides, corroborando os resultados funcionais obtidos.

O grupo Angus de baixa fertilidade se destacou pela menor concentração praticamente em todas as classes lipídicas e elevada concentração de colesterol, com resultados que apontam uma relação com alteração do metabolismo energético, estresse oxidativo e a possibilidade de precocidade dos processos de capacitação e reação acrossomal. Os resultados aqui apresentados, corroborando com a literatura, deixam claro que fertilidade possui grande dependência do perfil lipídico dos espermatozoides. Mais que meros componentes das membranas plasmática e acrossomal, contribuindo para a manutenção da integridade celular, as diferentes classes lipídicas atuam no controle da fluidez e na arquitetura de microdomínios de membrana, produzem moléculas de sinalização com ação sobre a fisiologia e cinética espermáticas, contribuem para o metabolismo energético e, portanto, para a viabilidade espermática.

### **Perfil metabólico**

Levando em consideração o papel dos lipídios na viabilidade de espermatozoides, juntamente com os resultados obtidos nas análises funcionais, as carnitinas se destacam pelo seu papel de interação com lipídios no metabolismo

energético das células espermáticas e ação antioxidante. Os estudos sobre a ação das carnitinas nas células espermáticas foi impulsionado pela identificação de sua concentração elevada na cauda do epidídimo de várias espécies de mamíferos. Secretadas pelas células epiteliais e incorporadas aos espermatozoides ali armazenados, as mesmas foram relacionadas com a sua maturação e metabolismo energético (CASILLAS, 1973; VAZ e WANDERS, 2002; AGARWAL e SAID, 2004). Os estudos subsequentes se concentraram principalmente em L-carnitina e acetilcarnitina presentes em células espermáticas e plasma seminal, seguindo resultados observados em outros tecidos. Em espermatozoides, foi verificado que a L-carnitina e seus ésteres, atuam, quando necessário, como cofatores essenciais no transporte de ácidos graxos de cadeia longa para a matriz mitocondrial, facilitando os processos de  $\beta$ -oxidação e produção de energia (ATP) (Figura 86). Também agem como antioxidantes pela remoção de subprodutos do metabolismo celular, como EROs, com a capacidade de sequestrar moléculas de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, além de quelar íons de metais de transição e estimular a geração de GSH (ALIABADI, MEHRANJANI, *et al.*, 2012; MONGIOI, CALOGERO, *et al.*, 2016; YANG, WANG, *et al.*, 2020; NAZARI, SALEHPOUR, *et al.*, 2021; RIBAS, VARGAS e WAJNER, 2014) (Figura 87). Quanto à acetilcarnitina, os estudos demonstraram que a mesma tem papel crucial no controle da produção energética por meio da modulação das concentrações de coenzima A (CoA) e acetil-CoA pela sua habilidade de doar e receber um grupo acetil, e ação sobre a atividade das enzimas piruvato desidrogenase e carnitina aciltransferase (LIU, HEAD, *et al.*, 2004; ZOU, YANG, *et al.*, 2017; YANG, WANG, *et al.*, 2020) (Figura 86). Desta forma, o papel das carnitinas na qualidade espermática de várias espécies de mamíferos, incluindo bovinos, ganhou importância. Há, atualmente, grande foco na investigação da suplementação alimentar de carnitinas ou adição em diluidores em estudos de subfertilidade e infertilidade causados por alterações morfológicas, cinéticas, estresse térmico, oxidativo, fragmentação de DNA e para minimizar danos da criopreservação (SATO, KUROSAWA, *et al.*, 2008; BUCAK, TUNCER, *et al.*, 2010; ZOU, YANG, *et al.*, 2017; MICIC, LALIC, *et al.*, 2019; LAGARES, DA SILVA, *et al.*, 2021).

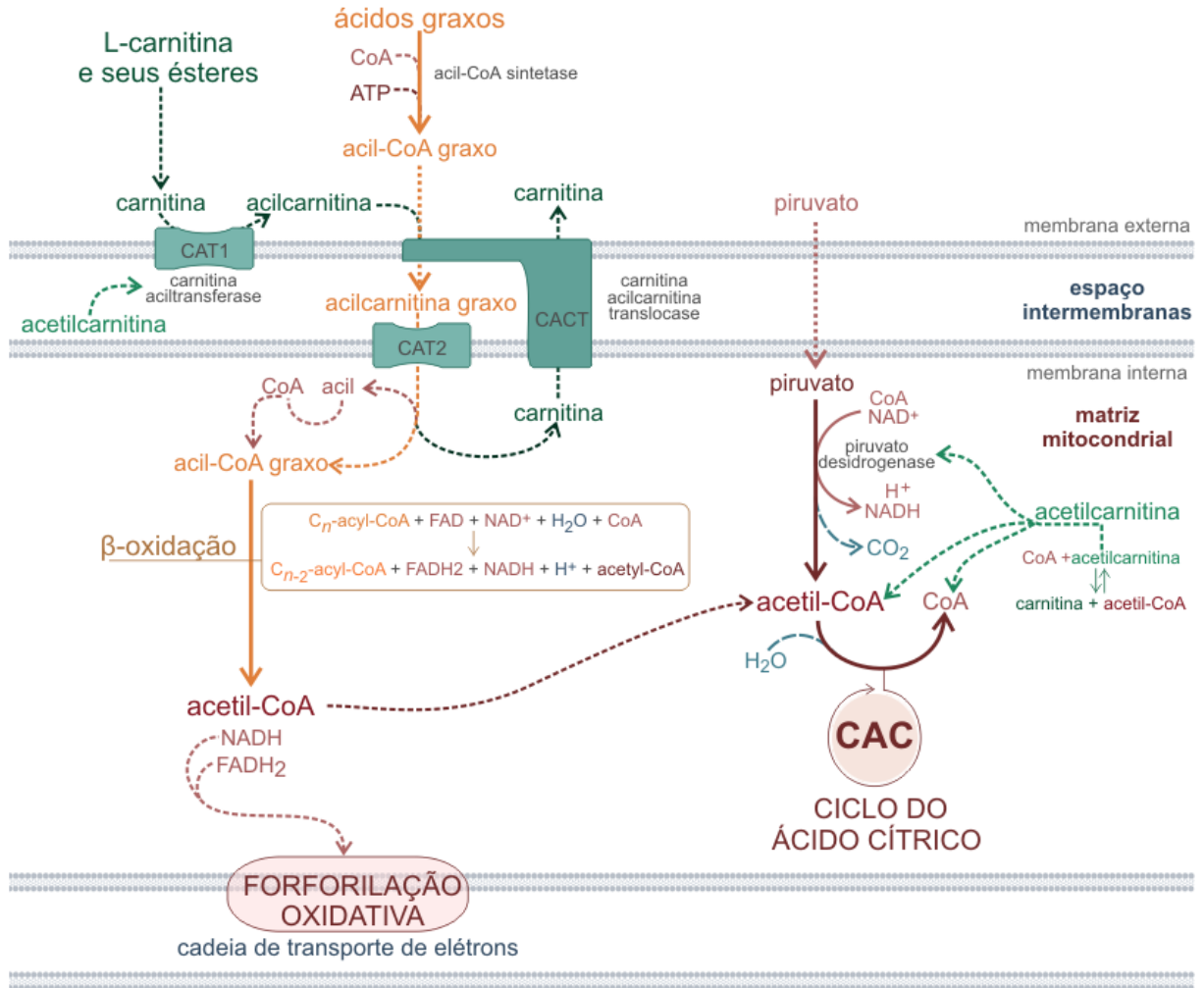
Entre as carnitinas detectadas neste estudo, além da L-carnitina e acetilcarnitina, deve-se ainda considerar os resultados observados para a palmitoil-L-carnitina, estearoil-L-carnitina e octanoil-L-carnitina. Estas se destacaram nas

análises multivariadas, com *loadings* e *VIP-scores* elevados, contribuindo de forma significativa na variação observada e separação dos grupos de alta e baixa fertilidade nas duas raças. Entre as carnitinas acima citadas, com exceção apenas da acetilcarnitina, todas apresentaram maior concentração nos animais de alta fertilidade nas amostras de Angus e Nelore. Corroborando com os estudos sobre o papel das carnitinas nas células espermáticas e os resultados funcionais obtidos, além de maior concentração, o grupo Angus de alta fertilidade teve correlação positiva entre estearoil-L-carnitina e PMM alto e integridade de membranas plasmática e acrossomal, e inversa com TBARS. No mesmo grupo houve correlação positiva entre palmitoil-L-carnitina e integridade de membrana plasmática, bem como inversa com TBARS e suscetibilidade à fragmentação de DNA. Em relação ao grupo Nelore de alta fertilidade, houve correlação positiva entre acetilcarnitina e octanoil-L-carnitina com índice de atividade mitocondrial e integridade de membranas plasmática e acrossomal, enquanto a octanoil-L-carnitina apresentou ainda correlação inversa com presença de EROs e suscetibilidade à fragmentação de DNA. Por fim, houve correlação positiva entre L-carnitina e presença de EROs em Angus de alta fertilidade e com alta atividade mitocondrial em Nelore de alta fertilidade. Considerando-se que esses dois grupos apresentaram maior atividade mitocondrial sem estresse oxidativo, as maiores concentrações e correlações observadas podem ser justificadas pela ação da L-carnitina e seus ésteres, não apenas no estímulo da produção de energia, mas também pela sua ação antioxidante, na eliminação de excesso de EROs. Desta forma, a contribuição das carnitinas para a manutenção da homeostase oxidativa, pode levar à uma maior proteção da integridade das membranas e da cromatina dos espermatozoides (ALIABADI, MEHRANJANI, *et al.*, 2012; BUCAK, TUNCER, *et al.*, 2010; MONGIOI, CALOGERO, *et al.*, 2016; MICIC, LALIC, *et al.*, 2019; ZHANG e CUI, 2020).

Em contrapartida, entre as carnitinas selecionadas, houve apenas maior concentração de acetilcarnitina nas amostras dos grupos de baixa fertilidade. Nestes, foi observada correlação positiva entre acetilcarnitina e presença de EROs e, apenas nos Nelores de baixa fertilidade, correlação positiva com PMM médio. Pelo fato da acetilcarnitina atuar no controle da atividade mitocondrial pela modulação das concentrações de CoA e acetil-CoA, estes resultados levantam a possibilidade de que a sua maior concentração nos grupos de baixa fertilidade esteja relacionada com as alterações observadas na atividade mitocondrial, especialmente

no grupo Angus de baixa fertilidade, que apresentou ainda maior presença de EROs (ALIABADI, MEHRANJANI, *et al.*, 2012; MONGIOI, CALOGERO, *et al.*, 2016; ZOU, YANG, *et al.*, 2017; ZHANG e CUI, 2020).

Figura 86 - Vias de ação da acetilcarnitina e da L-carnitina e seus ésteres no metabolismo energético das células espermáticas



Fonte: Leite (2022) com base em dados do PubChem (KIM, CHEN J, *et al.*, 2021) e DAVID (HUANG, SHERMAN e LEMPICKI, 2009; HUANG, SHERMAN e LEMPICKI, 2009).

A acetilcarnitina atua na modulação: de concentrações de coenzima A (CoA) e acetil-CoA, por sua capacidade de doar e receber o grupo acetil; da atividade da enzima piruvato desidrogenase, que age na síntese de acetil-CoA a partir do piruvato; e da atividade da enzima carnitina aciltransferase (CAT1), que atua na conversão de carnitina em acilcarnitina, a qual transporta acil-CoA graxo para a matriz mitocondrial. A L-carnitina e seus ésteres (como propionil, butiril, lauroil, palmitoil e estearoil-L-carnitina, por exemplo) são convertidos em acilcarnitina, pela ação da CAT, para o transporte de moléculas de acil-CoA graxo (geradas a partir de ácidos graxos livres pela ação da acil-CoA sintetase) para a matriz mitocondrial. Esse transporte ocorre em duas etapas, com a acilcarnitina se unindo à molécula de acil-CoA graxo, formando acilcarnitina graxo, que é transportada para o espaço intermembranas pela carnitina acilcarnitina translocase (CACT). Em seguida, pela ação da carnitina aciltransferase presente na membrana interna (CAT2), a acilcarnitina graxo é transportada para a matriz mitocondrial e separada em de acil-CoA graxo e carnitina. A carnitina é transportada para fora da mitocôndria pela CACT e a molécula de acil-CoA graxo é utilizada no processo de β-oxidação, o

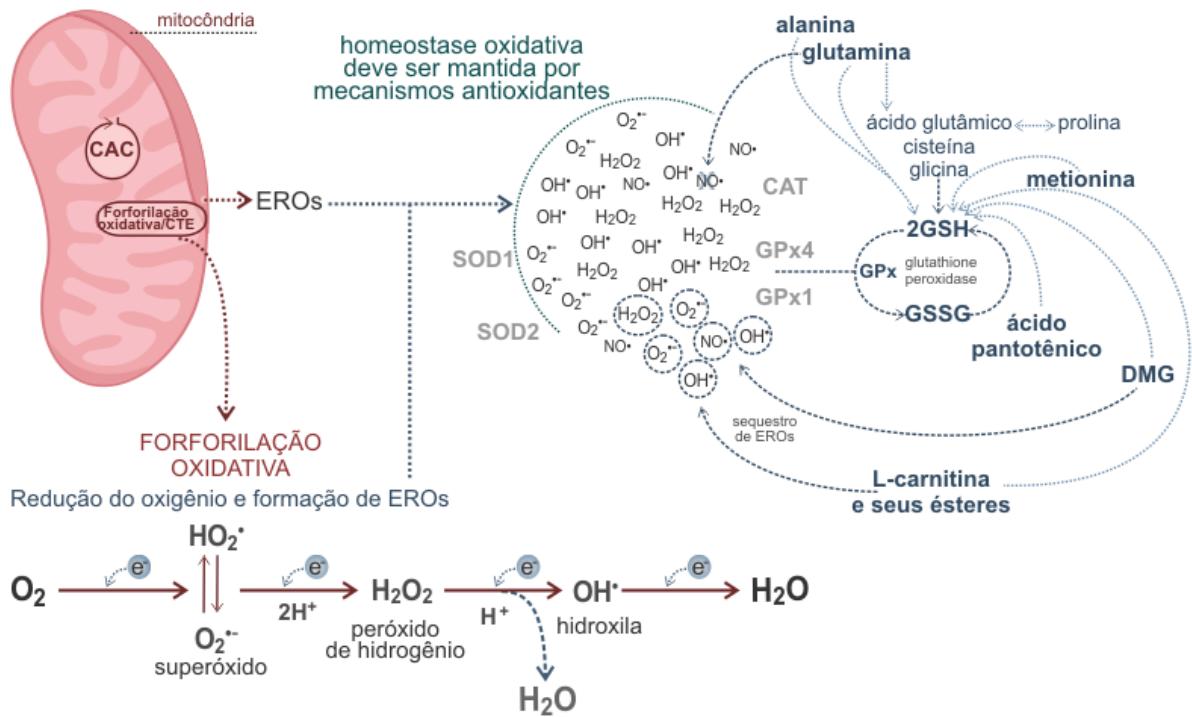
qual gera acetil-CoA (substrato para o ciclo do ácido cítrico), NADH e FADH<sub>2</sub> (utilizados na cadeia de transporte de elétrons).

Além da ação das carnitinas na remoção de excesso de EROs, as células espermáticas contam com um sistema antioxidante que envolve, por exemplo, catalase, superóxido dismutase e glutaciona peroxidase. No entanto, a glutaciona, uma pequena molécula ubíqua, possui importante papel antioxidante nas células espermáticas, principalmente como cofator no acionamento da glutaciona peroxidase (BILODEAU, CHATTERJEE, *et al.*, 2000; AITKEN e CURRY, 2011; NADRI, TOWHIDI, *et al.*, 2020) (Figura 87). Nos espermatozoides, este tripeptídeo é encontrado em sua forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), sendo que a sua concentração, bem como a relação entre as concentrações de GSH/GSSG são usados como marcadores de homeostase ou estresse oxidativo (KOPPERS, DE IULIIS, *et al.*, 2008; BUCAK, TUNCER, *et al.*, 2010; GAUCHER, BOUDIER, *et al.*, 2018). A avaliação de razão entre GSH e GSSG não foi obtida no presente estudo pois os resultados de GSSG foram obtidos em *area ratio* com um terceiro padrão interno nas amostras avaliadas. Entretanto, foi observada uma maior concentração e *area ratio* da glutaciona nas formas reduzida e oxidada, respectivamente, nos animais de baixa fertilidade. Vale notar que não houve interação para estes dois metabólitos, com o agrupamento de Angus e Nelore de baixa fertilidade nas análises. Este fato é importante pois apenas o grupo Angus de baixa fertilidade apresentou uma maior presença de EROs na análise de *status* oxidativo. Neste grupo foi observada ainda correlação positiva de GSSG com maior suscetibilidade à peroxidação lipídica e fragmentação de DNA. Quanto à raça Nelore, não foram observadas correlações entre GSH e GSSG e variáveis funcionais. No entanto, nas análises multivariadas, GSH e GSSG estão entre os metabólitos com maior peso sobre a variância e separação dos grupos de alta e baixa fertilidade para as duas raças.

O papel da glutaciona na redução de quadros de estresse oxidativo e consequentes danos às estruturas espermáticas é bem conhecido, com estudos avaliando, inclusive, os efeitos benéficos da adição de GSH em diluidores. Estes observam que a adição de GSH, em doses corretas, é capaz de reestabelecer a homeostase oxidativa, reduzindo danos à membrana plasmática, fragmentação de DNA e iniciação de processos de apoptose, no entanto, demonstram ainda que o excesso de GSH pode causar efeitos deletérios, até mesmo por ação pró-oxidativa

(MESEGUER, MARTÍNEZ-CONEJERO, *et al.*, 2007; SHAH, SINGH, *et al.*, 2017; GAUCHER, BOUDIER, *et al.*, 2018; NADRI, TOWHIDI, *et al.*, 2020; SALMAN, CAAMAÑO, *et al.*, 2021). A maior presença de glutathiona nas amostras de baixa fertilidade, principalmente na sua forma reduzida, é relacionada com o seu papel em reações redox, sequestrando EROs para tentar reestabelecer a homeostase oxidativa da célula espermática. No entanto, é necessário reafirmar que não foi possível estabelecer a razão entre GSH e GSSG em cada grupo estudado para avaliar um perfil mais preciso destes metabólitos no *status* oxidativo, bem como estabelecer se a maior concentração de GSH poderia ter um efeito pró-oxidativo no grupo Angus de baixa fertilidade (MESEGUER, MARTÍNEZ-CONEJERO, *et al.*, 2007; GAUCHER, BOUDIER, *et al.*, 2018; SALMAN, CAAMAÑO, *et al.*, 2021).

Figura 87 - Formação de EROs durante a produção de energia das células espermáticas e metabólitos com ação antioxidante



Fonte: Leite (2022) com base em dados obtidos no PubChem (KIM, CHEN J, *et al.*, 2021) e DAVID (HUANG, SHERMAN e LEMPICKI, 2009; HUANG, SHERMAN e LEMPICKI, 2009).

A mitocôndria é a maior fonte de EROs em espermatozoides, principalmente pela redução de oxigênio em água que ocorre na cadeia de transporte de elétrons na fosforilação oxidativa. Os EROs gerados na mitocôndria são o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ). A produção destes, juntamente com a de óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ), apesar de ter papel importante na fisiologia espermática, deve ser mantida sobre controle de mecanismos antioxidantes para manter a homeostase e evitar um quadro de estresse oxidativo. Os mecanismos antioxidantes presentes nos espermatozoides são compostos inicialmente pelas enzimas superóxido dismutase (SOD, que atua sobre  $O_2^{\bullet -}$ , convertendo-o em  $H_2O_2$ ), catalase (CAT, que atua em  $H_2O_2$ , com a sua conversão em  $H_2O$  e  $O_2$ ) e glutathiona peroxidase (GPx, que como a CAT atua sobre  $H_2O_2$ , com a sua

conversão em H<sub>2</sub>O). A ação da GPx envolve a conversão da glutathiona reduzida (GSH) em oxidada (GSSG). Há outras moléculas importantes no mecanismo antioxidante, relacionadas diretamente com a biossíntese de GSH, como ácido glutâmico, cisteína e glicina, ou indiretamente, pelo estímulo à geração de GSH, como alanina, glutamina, metionina, dimetilglicina (DMG), carnitinas e ácido pantotênico, por exemplo. A glutamina atua ainda na inibição de formação de NO• e pela interação com fosfolipídios de membrana para interromper a peroxidação lipídica, enquanto a DMG e carnitinas possuem ação antioxidante por mecanismos de sequestro de moléculas de EROs.

Importantes na manutenção da viabilidade da célula espermática, como os demais metabólitos, os aminoácidos vêm sendo estudados nos últimos anos como suplementação em diluidores de muitas espécies, especialmente em humanos e animais de produção. Isto porque que a função dos aminoácidos vai muito além da síntese de proteínas, estes metabólitos atuam ainda como precursores de outros aminoácidos e macromoléculas, no metabolismo energético e em mecanismos de proteção da célula contra efeitos deletérios de EROs e denaturação de DNA (SANGEETA, ARANGASAMY, *et al.*, 2015; DONG, WU, *et al.*, 2016; ZHAO, ZHANG, *et al.*, 2018; ABDULKAREEM, IBRAHIM, *et al.*, 2020). As análises realizadas no presente estudo permitiram a detecção e quantificação, em ng/mL pelo método target, de um grande painel de aminoácidos essenciais e não essenciais em touros, como os ácidos aspártico, glutâmico, alanina, arginina, fenilalanina, glicina, isoleucina, leucina, metionina, prolina, serina, tirosina, treonina, triptofano e valina, além da quantificação por *area ratio* de citrulina, glutamina, homocisteína e os derivados de aminoácidos creatina e dimetilglicina.

Os resultados mostram diferença entre as raças estudadas na quantificação total de aminoácidos, com maior presença na raça Nelore, no entanto, o maior destaque está na comparação entre os grupos de alta e baixa fertilidade na raça Angus. O grupo Angus de alta fertilidade apresentou maior concentração de ácidos aspártico e glutâmico, prolina, metionina, treonina e valina, metabólitos que atuam de forma importante no metabolismo energético e na manutenção da homeostase oxidativa pela sua ação sobre EROs (HERNVANN, GONZALES, *et al.*, 1986; ÇOYAN, BASPINAR, *et al.*, 2010; DONG, WU, *et al.*, 2016; NARUD, KLINKENBERG, *et al.*, 2020; PEÑA, ORTIZ-RODRÍGUEZ, *et al.*, 2021). Em contrapartida, o grupo Angus de baixa fertilidade apresentou apenas maior presença de homocisteína e glicina. Em relação à maior presença de homocisteína, é importante considerar que a mesma é formada a partir da demetilação da metionina, com menor concentração no grupo, a qual, além de ação antioxidante é molécula cujo metabolismo está envolvido na produção de GSH (BIANCHI, BRIZI, *et al.*, 2000;

BUCAK, TUNCER, *et al.*, 2010; ÇOYAN, BASPINAR, *et al.*, 2010) (Figura 87). Além disso, há estudos com espermatozoides de humanos que relacionam a maior concentração de homocisteína a problemas cinéticos, defeitos morfológicos, estresse oxidativo e perda da competência funcional (AITKEN, FLANAGAN, *et al.*, 2016; LIU, PAN, *et al.*, 2017). Corroborando estas observações, além dos resultados observados nas análises funcionais, houve no grupo Angus de baixa fertilidade correlação positiva da homocisteína com suscetibilidade à peroxidação lipídica e fragmentação de DNA e inversa com atividade mitocondrial e integridade de membranas plasmática e acrossomal. A importância da homocisteína na comparação dos grupos da raça Angus é validada ainda pelos seus altos valores de *loading* e *VIP score* nos resultados das análises multivariadas.

A menor concentração de vários aminoácidos, como observado nas amostras de Angus de baixa fertilidade, foi relacionada, em estudos anteriores, com subfertilidade em humanos e touros (HERNVANN, GONZALES, *et al.*, 1986; ZHAO, ZHANG, *et al.*, 2018; NARUD, KLINKENBERG, *et al.*, 2020). No entanto, este resultado também levanta a hipótese, considerando-se os resultados que apontam para a provável presença de uma maior porcentagem de células em processo de capacitação e reação acrossomal precoces, de que esta menor quantidade de aminoácidos pode estar relacionada à ação da L-aminoácido oxidase (LAAO). Esta enzima, que já foi identificada em várias espécies, incluindo bovinos, se encontra no acrossomo e a sua ação envolve a desaminação oxidativa de aminoácidos aromáticos, como a fenilalanina, tirosina e triptofano, gerando peróxido de hidrogênio e amônia (HOUSTON, CURRY e AITKEN, 2015; ZHANG, LIU, *et al.*, 2021). Tal hipótese também contribui para explicar a maior presença de EROs no grupo Angus de baixa fertilidade.

Quanto à raça Nelore, não foram observadas diferenças semelhantes entre os grupos de alta e baixa fertilidade, com a concentração maior de aminoácidos distintos nos dois grupos. O grupo Nelore de alta fertilidade, como o Angus, apresentou maior concentração dos ácidos aspártico (aspartato) e glutâmico (glutamato), ambos com funções importantes no metabolismo energético das células espermáticas. O ácido aspártico possui papel fundamental na lançadeira malato-aspartato, um conjunto de reações que permite o transporte de elétrons produzidos no citosol durante a glicólise para o interior da mitocôndria, mecanismo que permite que o NADH seja oxidado a NAD<sup>+</sup>, o qual consegue penetrar na matriz mitocondrial,



onde é reduzido novamente a NADH (D'ANIELLO, RONSINI, *et al.*, 2012; BARBATO, TALEVI, *et al.*, 2017; LOSANO, ANGRIMANI, *et al.*, 2018; GUARENTE, 2016) (Figura 88). De fato, os dois grupos de alta fertilidade, tiveram correlação positiva entre ácido aspártico e alta atividade mitocondrial (Angus) e potencial de membrana mitocondrial alto (Nelore). O ácido glutâmico, por sua vez, é precursor do ácido  $\alpha$ -cetoglutárico, o qual participa do ciclo do ácido cítrico (ORTIZ-RODRÍGUEZ, MARTÍN-CANO, *et al.*, 2020; PEÑA, ORTIZ-RODRÍGUEZ, *et al.*, 2021). Foi observada também maior presença de alanina e glutamina, metabólitos sem interação, nas amostras de alta fertilidade, ambos atuando também em processos do metabolismo energético e controle da homeostase oxidativa. A alanina, além de ser um dos aminoácidos mais utilizados na síntese proteica, participa de vários processos celulares, como o metabolismo de açúcares, ácidos orgânicos e a reação de conversão/reversão alanina-piruvato (HALANGK, BOHNENSACK, *et al.*, 1985; MENEZES, VELHO, *et al.*, 2019). Quanto à glutamina, além da sua atuação em mecanismos antioxidantes, por promover a biossíntese de glutathione e, mesmo na sua forma livre, interagir com fosfolípidios da membrana plasmática para interromper a peroxidação lipídica e inibir a formação de óxido nítrico, a mesma pode auxiliar o metabolismo energético por meio do processo de glutaminólise, o qual resulta na formação de ácido  $\alpha$ -cetoglutárico, que participa do ciclo do ácido cítrico (KUMAR, KROETSCH, *et al.*, 2015; NADRI, TOWHIDI, *et al.*, 2020; KOOHESTANIDEHAGHI, TORKAMANPARI, *et al.*, 2020; PEÑA, ORTIZ-RODRÍGUEZ, *et al.*, 2021) (Figuras 87 e 88).

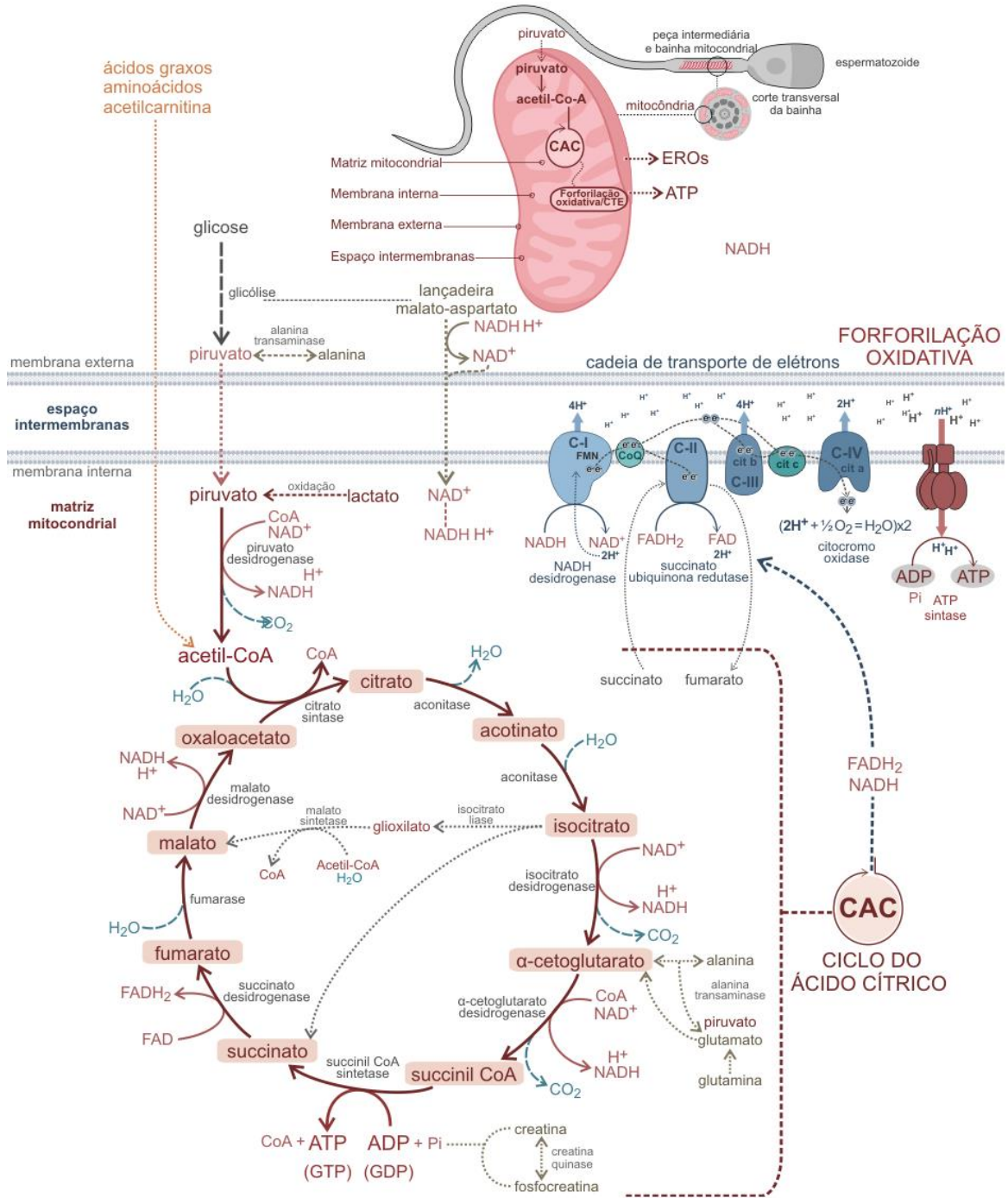
Os grupos de baixa fertilidade apresentaram maior presença dos derivados de aminoácidos creatina e dimetilglicina, com maior quantidade em Angus do que em Nelore. A creatina é um metabólito importante na reciclagem de ATP na mitocôndria por meio da sua fosforilação pela ação da enzima creatina quinase, gerando ADP e fosfocreatina, que, por sua vez, serve de doadora de um grupo fosfato para a uma nova conversão de ADP em ATP (PEÑA, ORTIZ-RODRÍGUEZ, *et al.*, 2021). Por sua ação na produção de energia, a creatina e a creatina quinase são objeto de estudos em espermatozoides, os quais observaram o seu papel no aumento da motilidade, bem como nos processos de capacitação e reação acrossomal (HUSZAR, VIGUE e OEHNINGER, 1994; FERNÁNDEZ e CÓRDOBA, 2017; UMEHARA, TSUJITA, *et al.*, 2020). A maior presença de dimetilglicina (DMG), resultante da metabolização de colina e glicina e também um subproduto do metabolismo da homocisteína, por outro

lado, pode estar relacionada à sua ação antioxidante e participação no metabolismo da glutathiona. Apesar de não haver muitos estudos envolvendo o seu papel antioxidante em espermatozoides, a presença e suplementação da mesma são associadas à redução de quadros de estresse oxidativo e normalização da função mitocondrial em embriões e células de vários tecidos (BAI, XU, *et al.*, 2016; TAKAHASHI, SASAKI, *et al.*, 2016; JARAK, ALMEIDA, *et al.*, 2018; BAI, JIANG, *et al.*, 2019; ORTIZ-RODRÍGUEZ, MARTÍN-CANO, *et al.*, 2020) (Figura 87).

Espermatozoides são células com alta demanda energética, portanto, direta ou indiretamente a maior parte dos metabólitos detectados neste estudo possui papel no metabolismo energético dos mesmos. O ciclo do ácido cítrico (CAC) e a fosforilação oxidativa, que ocorrem na cadeia de mitocôndrias presentes na peça intermediária, constituem via metabólica fundamental para a produção de ATP nas células espermáticas de mamíferos, com participação essencial de diversos ácidos orgânicos (TANG, LIU, *et al.*, 2014; VELHO, MENEZES, *et al.*, 2018; MENEZES, VELHO, *et al.*, 2019). No CAC, o ácido pirúvico (piruvato), obtido principalmente a partir da glicólise, entra na mitocôndria e é oxidado pela piruvato desidrogenase em acetil-CoA, alimentando assim o sistema de produção de energia do ciclo (LOSANO, ANGRIMANI, *et al.*, 2018; PEÑA, ORTIZ-RODRÍGUEZ, *et al.*, 2021). Além do piruvato gerado na glicólise, o ácido láctico (lactato) também é importante fonte para alimentação do ciclo, sendo oxidado à piruvato pelo complexo de oxidação mitocondrial do lactato, mecanismo chave na obtenção de piruvato intra-mitocondrial (ZHAO, ZHANG, *et al.*, 2018; PEÑA, ORTIZ-RODRÍGUEZ, *et al.*, 2021). O CAC segue em uma série de reações contínuas em circuito fechado. A partir da combinação de acetil-CoA e ácido oxaloacético (oxaloacetato), com a formação de ácido cítrico (citrato), o CAC é composto pela conversão sequencial de metabólitos, principalmente ácidos orgânicos, como o ácido isocítrico (isocitrato), ácido  $\alpha$ -cetoglutárico ( $\alpha$ -cetoglutarato), succinil-CoA, ácido succínico (succinato), ácido fumárico (fumarato) e ácido málico (malato), gerando no processo moléculas de NADH, FADH<sub>2</sub> e ATP ou GTP (ZHAO, ZHANG, *et al.*, 2018; FU, LIU, *et al.*, 2019). O CAC está ligado ainda à fosforilação oxidativa, com uso de NADH e FADH<sub>2</sub>, na cadeia de transporte de elétrons, fundamental para a produção de energia na forma de ATP (LOSANO, ANGRIMANI, *et al.*, 2017) (Figura 88). A participação dos ácidos orgânicos no metabolismo energético de espermatozoides é bem evidenciada pela

ação fundamental dos mesmos no CAC, sendo que a maior parte dos participantes do ciclo foi detectada neste estudo.

Figura 88 - Vias do metabolismo energético das células espermáticas, destacando o ciclo do ácido cítrico e forsporilação oxidativa



Fonte: Leite (2022) com base em dados obtidos no PubChem (KIM, CHEN J, *et al.*, 2021), DAVID (HUANG, SHERMAN e LEMPICKI, 2009; HUANG, SHERMAN e LEMPICKI, 2009) e informações de Losano et al. (LOSANO, ANGRIMANI, *et al.*, 2018) e Peña et al. (PEÑA, ORTIZ-RODRÍGUEZ, *et al.*, 2021).

Molécula essencial para a produção de energia, o ácido pirúvico (piruvato) é obtido principalmente a partir da glicólise, mas pode ser ainda sintetizado a partir da transaminação da alanina e pela

oxidação do lactato, esta última sendo um mecanismo importante para a obtenção de piruvato intra-mitocondrial. Na matriz mitocondrial, sob a ação da piruvato desidrogenase o piruvato, com participação de coenzima A e  $\text{NAD}^+$ , é convertido em acetil-CoA, molécula fundamental para o ciclo do ácido cítrico (CAC) e produção de energia (ATP ou GTP). Além de sintetizada a partir do piruvato, a acetil-CoA pode ser gerada a partir da oxidação de ácidos graxos, aminoácidos e pela doação de um grupo acetil pela acetilcarnitina. A partir da ação da citrato sintetase sobre o ácido oxaloacético (oxaloacetato) e acetil-CoA, com a formação de ácido cítrico (citrato), o ciclo segue em uma série de reações contínuas. O citrato é convertido em acotinato pela aconitase, com liberação de uma molécula de  $\text{H}_2\text{O}$ , o que é seguido pela formação de ácido isocítrico (isocitrato) pela isocitrato desidrogenase com adição de  $\text{H}_2\text{O}$ . Em seguida, com duas reações de descarboxilação oxidativa, com utilização de  $\text{NAD}^+$  e liberação de  $\text{NADH}$ ,  $\text{H}^+$  e dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), o ácido isocítrico é convertido em ácido  $\alpha$ -cetoglutárico ( $\alpha$ -cetoglutarato). Apesar de o CAC ser visto como uma série de reações em cadeia em circuito fechado, a ação de enzimas sobre moléculas em maior ou menor disponibilidade pode levar à síntese de novas moléculas que atuam no ciclo, como por exemplo, a formação de  $\alpha$ -cetoglutarato pela ação da alanina transaminase, um processo reversível que pode gerar, a partir do  $\alpha$ -cetoglutarato, alanina e ácido glutâmico (glutamato) e piruvato, respectivamente. De forma semelhante, a glutamina pode gerar glutamato e em seguida  $\alpha$ -cetoglutarato. No ciclo, o  $\alpha$ -cetoglutarato é convertido em succinil-CoA, pela ação da  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase e adição de  $\text{NAD}^+$  e CoA, gerando ainda  $\text{NADH}$  e  $\text{CO}_2$ . A succinil-CoA é então convertida em ácido succínico (succinato), pela ação da succinil-CoA sintetase, com a geração de uma molécula de ATP a partir da fosforilação de ADP (ou GTP a partir de GDP). O succinato é oxidado a ácido fumárico (fumarato) pela ação da succinato desidrogenase, com a transferência de átomos de hidrogênio para o dinucleotídeo flavina adenina (FAD) e formação de  $\text{FADH}_2$ . Pela ação da fumarase e adição de uma molécula de  $\text{H}_2\text{O}$ , o fumarato é convertido em ácido málico (malato), o qual é convertido em oxaloacetato pela malato desidrogenase, com a formação de  $\text{NADH}$ ,  $\text{H}^+$  a partir de  $\text{NAD}^+$ . Por fim, o oxaloacetato se combina com outra molécula de acetil-CoA, fechando e reiniciando o ciclo. O ciclo está ligado à fosforilação oxidativa, fornecendo  $\text{NADH}$  e  $\text{FADH}_2$  para a cadeia de transporte de elétrons (CTE). Outra fonte importante de  $\text{NADH}$  é o mecanismo chamado de lançadeira malato-aspartato, um conjunto de reações que permite que o  $\text{NADH}$  seja oxidado a  $\text{NAD}^+$ , o qual consegue penetrar na matriz mitocondrial, onde é reduzido novamente a  $\text{NADH}$ . A CTE é composta por complexos de proteínas (complexo I, C-I; complexo II, C-II; complexo III, C-III; e complexo IV, C-IV), e outras moléculas, como ubiquinona (coenzima Q, CoQ) e citocromo c (cit c), que transferem elétrons via reações redox e bombeiam prótons ( $\text{H}^+$ ) para o espaço intermembranas. Esta transferência de prótons cria um gradiente eletroquímico entre a matriz mitocondrial e o espaço intermembranas que leva à geração de moléculas de ATP. O mononucleotídeo de flavina (FMN) faz parte do C-I e atua no transporte de elétrons deste para a CoQ. No C-II, no processo de redução de  $\text{FADH}_2$  a FAD, há a participação do succinato, que por meio da ação succinato ubiquinona redutase, gera uma molécula de fumarato. A geração de moléculas de ATP no CAC e na fosforilação oxidativa depende da fosforilação de ADP com a participação de fosfato inorgânico (Pi), e a creatina é considerada uma importante fonte de Pi na mitocôndria.

Os resultados mostram uma semelhança entre as raças quanto às diferenças observadas entre alta e baixa fertilidade. Os grupos Angus e Nelore de alta fertilidade apresentaram maior quantidade dos ácidos cítrico, isocítrico, succínico, adenilsuccínico e  $\gamma$ -aminobutírico (GABA). No grupo Angus de alta fertilidade houve ainda correlação positiva entre ácido adenilsuccínico e alta atividade mitocondrial e entre ácido isocítrico e PMM alto, bem como inversa entre ácido cítrico e suscetibilidade à peroxidação lipídica. No mesmo grupo, houve correlação inversa

entre ácido pirúvico e atividade mitocondrial, integridade de membranas plasmática e acrossomal. No grupo Nelore de alta fertilidade, vale destacar o papel do ácido láctico, que apesar da ausência de interação para este metabólito, foi observada maior presença na raça Nelore. Esta maior presença pode ser corroborada pelas análises de correlação no grupo de alta fertilidade, nas quais o ácido láctico possui correlação positiva com alta atividade mitocondrial, integridade de membrana e inversa com suscetibilidade à peroxidação lipídica.

Os resultados dos grupos de alta fertilidade, associados ao *status* funcional, com uma maior porcentagem das células com índice elevado de atividade mitocondrial associado a alto potencial de membrana mitocondrial, acompanhados de homeostase oxidativa, são indicativos de um consumo de piruvato e lactato e geração de intermediários do ciclo do ácido cítrico bem como de moléculas com funções importantes na cadeia transportadora de elétrons (PAIVA, AMARAL, *et al.*, 2015; ZHAO, ZHANG, *et al.*, 2018; MEMILI, MOURA e KAYA, 2020). Entretanto, estudos recentes em humanos e bovinos, correlacionam a maior presença de ácido láctico com alta fertilidade, principalmente pelo fato do mesmo ser reconhecido, atualmente, com uma importante molécula motora do ciclo do ácido cítrico (MENEZES, VELHO, *et al.*, 2019; MEMILI, MOURA e KAYA, 2020; MUMCU, KARAER, *et al.*, 2020). Os resultados aqui apresentados levantam a possibilidade de oxidação intra-mitocondrial de ácido láctico em pirúvico e, o consumo de ambos na alta atividade mitocondrial observada nas amostras dos grupos de alta fertilidade, acompanhada de maior abundância de ácido cítrico.

Outro resultado relevante observado nos grupos Angus e Nelore de alta fertilidade é a maior concentração de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), que apresentou ainda valores elevados na resposta da variância e de VIP score nas análises multivariadas entre alta e baixa fertilidade nas duas raças. Formado pela descarboxilação do ácido glutâmico, o GABA é considerado uma importante molécula de sinalização em espermatozoides de várias espécies. Estudos demonstram que está associado à modulação dos processos de capacitação e reação acrossomal por meio da ativação ou não de seus receptores. Estes estudos associam ainda a sua maior concentração a indivíduos com alta fertilidade (DE LAS HERAS, VALCARCEL e PEREZ, 1997; PUENTE, TARTAGLIONE e RITTA, 2011; PAIVA, AMARAL, *et al.*, 2015; MENEZES, VELHO, *et al.*, 2019).

Quanto aos grupos de baixa fertilidade, como mencionado, foi observada maior concentração de ácidos pirúvico e láctico. Substratos essenciais para o funcionamento do ciclo do ácido cítrico, estes são usados inclusive na suplementação de diluidores para criopreservação espermática em várias espécies (MALO, GIL, *et al.*, 2010; QIU, LI, *et al.*, 2016; GALARZA, LÓPEZ-SEBASTIÁN e SANTIAGO-MORENO, 2020; HERNÁNDEZ-AVILÉS, RAMÍREZ-AGÁMEZ, *et al.*, 2021). No entanto, a interpretação desta maior presença deve ser associada novamente com o *status* funcional nestes grupos, nos quais foram observadas alterações na função mitocondrial. Portanto, há indícios de que a maior concentração dos ácidos pirúvico e láctico observada nos grupos de baixa fertilidade esteja relacionada com problemas na atividade mitocondrial no que se refere ao consumo destes substratos no CAC, com reflexo na cadeia de transporte de elétrons e PMM. As análises de correlação mostram ainda, no grupo Angus de baixa fertilidade correlação positiva entre ácido láctico e suscetibilidade à peroxidação lipídica. O mesmo ocorreu no grupo Nelore de baixa fertilidade, que apresentou ainda correlação inversa entre os ácidos láctico e pirúvico com PMM alto e correlação positiva entre ácido láctico e PMM médio.

Foi detectada maior concentração de  $\alpha$ -cetoglutárico apenas no grupo Angus de baixa fertilidade, resultado que pode ser associado, como acima, às alterações na função mitocondrial. No entanto, vale citar que estudos recentes identificaram maior concentração do mesmo em amostras humanas com padrões espermáticos anormais e de subfertilidade (ZHAO, ZHANG, *et al.*, 2018; MUMCU, KARAER, *et al.*, 2020). Por fim, foi observado maior presença de ácidos málico e pantotênico nas amostras de baixa fertilidade. Quanto ao ácido málico, pelo seu papel no ciclo do ácido cítrico e no mecanismo de lançadeira malato-aspartato, a justificativa de disrupção da atividade mitocondrial também poderia ser aplicada. Por outro lado, a maior presença de ácido pantotênico, apesar do mesmo ser essencial para a biossíntese de CoA, pode estar associada à sua ação antioxidante, com o mesmo apresentando inclusive correlação positiva com presença de EROs (WOJTCZAK e SLYSHENKOV, 2003; WALCZAK-JEDRZEJOWSKA, WOLSKI e SLOWIKOWSKA-HILCZER, 2013; SELVARAJU, PARTHIPAN, *et al.*, 2018). Portanto, a análise da presença de ácidos orgânicos demonstra novamente a importância da associação da análise metabólica à funcional para a interpretação dos resultados observados.

Nucleobases, nucleosídeos e nucleotídeos também são fundamentais no metabolismo energético de espermatozoides, tanto na glicólise quanto na fosforilação oxidativa. Entre estes, a adenina possui destaque, não apenas por ser uma das bases que compõem o DNA, mas por ser precursora da adenosina (pela combinação com uma ribose), monofosfato de adenosina (AMP, com adição de um grupo fosfato), AMP cíclico (pela hidrólise de AMP), difosfato de adenosina (ADP, com adição de dois grupos fosfato) e o trifosfato de adenosina (ATP, com adição de três grupos fosfato) (SCHUH, HILLE e BABCOCK, 2007; VADNAIS, CAO, *et al.*, 2014; PEÑA, ORTIZ-RODRÍGUEZ, *et al.*, 2021). Além de compor o ATP, molécula rica em energia, a adenina faz parte dos cofatores nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e da coenzima A (CoA) (Figura 88), enquanto seus nucleotídeos AMP e AMP cíclico constituem importantes moléculas de sinalização relacionadas à motilidade espermática e ao processo de reação acrossomal (ATKINSON, 1968; HALANGK, BOHNENSACK, *et al.*, 1985; VADNAIS, CAO, *et al.*, 2014).

Os resultados obtidos neste estudo apresentam o mesmo padrão para a adenina e seus derivados na raça Angus, com maior presença de adenina, adenosina, AMP e AMP cíclico no grupo de baixa fertilidade. Quanto à raça Nelore, também foi detectada maior quantidade de AMP e AMP cíclico nas amostras de baixa fertilidade. Estudos demonstram que quando há alta demanda por ATP, os níveis de AMP, subproduto da reação de transfosforilação por adenilato quinases (AK) para produzir ATP a partir do ADP, também aumentam (ATKINSON, 1968; SCHUH, HILLE e BABCOCK, 2007; VADNAIS, CAO, *et al.*, 2014). Além disso, é importante considerar que o AMP pode controlar enzimas envolvidas na via glicolítica, modulando desta forma o metabolismo energético do espermatozoide (VADNAIS, CAO, *et al.*, 2014; PEÑA, ORTIZ-RODRÍGUEZ, *et al.*, 2021). O maior nível de AMP observado nas amostras de baixa fertilidade pode estar mais uma vez relacionado às alterações observadas na função mitocondrial, principalmente considerando-se a necessidade de se aumentar a atividade mitocondrial em um mecanismo compensatório relacionado ao baixo PMM. Quanto ao AMP cíclico, o mesmo atua como mensageiro por meio da ativação da proteína quinase A (PKA) e, indiretamente, da fosforilação da proteína tirosina, que participa dos processos de capacitação e reação acrossomal (BAILEY, BILODEAU e CORMIER, 2000; LEFIÈVRE, JHA, *et al.*, 2002; AITKEN e CURRY, 2011). Além disso, há estudos que

demonstram que AMP e AMP cíclico possuem efeitos sobre o padrão de motilidade dos espermatozoides, com aumento não apenas da motilidade em si, mas da amplitude e frequência do batimento dos flagelos (VIJAYARAGHAVAN e HOSKINS, 1986; SCHUH, HILLE e BABCOCK, 2007; YI, SUTOVSKY, *et al.*, 2012). Com os resultados de cinética espermática observados, considerando principalmente o grupo Angus de baixa fertilidade, no qual houve ainda correlação inversa entre AMP cíclico e integridade de membrana acrossomal, há a possibilidade de que os maiores níveis de AMP e AMP cíclico estejam relacionados a uma maior porcentagem de células em processo de capacitação precoce nas amostras de baixa fertilidade.

Outro nucleotídeo importante no metabolismo energético foi também detectado com maior presença nos grupos de baixa fertilidade, o mononucleotídeo de flavina (FMN). Produzido a partir da riboflavina, o FMN está associado a várias proteínas e enzimas, como a flavoproteína que compõe o complexo I da cadeia de transporte de elétrons (CTE), e oxidoredutases, respectivamente (LANS, FRAGO e MEDINA, 2012). No complexo I, ocorre a ligação de uma molécula de NADH e doação de dois elétrons, os quais convertem o FMN à sua forma reduzida, FMNH<sub>2</sub>, o que por sua vez leva à transferência dos elétrons por uma série de aglomerados de ferro-enxofre para o complexo III (LANS, FRAGO e MEDINA, 2012; PEÑA, ORTIZ-RODRÍGUEZ, *et al.*, 2021). O FMN é considerado um importante agente oxidante pelo fato de poder transferir um elétron (FMNH•) ou dois elétrons (FMNH<sub>2</sub>) na CTE. Este nucleotídeo participa ainda como cofator no controle da produção de óxido nítrico (NO•), que por sua vez está envolvido na regulação da concentração de AMP cíclico no processo de capacitação (MIRAGLIA, DE ANGELIS, *et al.*, 2011; MACIEL, CALDAS-BUSSIÈRE, *et al.*, 2018). Portanto, conforme citado acima, a maior presença de FMN nos grupos de baixa fertilidade pode estar envolvida com a tentativa de se aumentar o potencial de membrana mitocondrial. Ademais, o grupo Angus de baixa fertilidade apresentou correlação positiva entre FMN e índice de atividade mitocondrial e PMM médio. Além disso, a maior quantidade de FMN levanta ainda a possibilidade de estar envolvida indiretamente na maior presença de AMP cíclico e um processo de capacitação precoce, o que talvez pudesse ser corroborado com a detecção da concentração de NO•.

As amostras de baixa fertilidade apresentaram ainda maior concentração dos nucleotídeos guanosina e inosina, bem como de nicotinamida (NAM). Estes metabólitos podem ser relacionados, como os demais, com o metabolismo



energético e possíveis alterações no mesmo. O primeiro é precursor, como a adenina, dos nucleotídeos GMP, GDP, GTP e GMP cíclico, por meio de sua fosforilação e hidrólise (WILLIPINSKI-STAPELFELDT, LÜBBERSTEDT, *et al.*, 2004). Entretanto, há poucos estudos sobre o papel dos nucleotídeos de guanosina na produção de energia em células espermáticas, com destaque maior aos derivados de adenina. Além disso, estudos realizados em humanos avaliam apenas o papel de sinalização das moléculas de GMP cíclico, demonstrando que a sinalização mediada por AMP cíclico é predominante em espermatozoides (WILLIPINSKI-STAPELFELDT, LÜBBERSTEDT, *et al.*, 2004; MIRAGLIA, DE ANGELIS, *et al.*, 2011). Quanto à inosina, apesar de escassos e apenas em plasma seminal, há estudos que relacionam a maior presença da mesma ao metabolismo energético pela sua possível ativação de piruvato oxidases e como fonte alternativa de conversão de AMP à ADP e ATP pela via hipoxantina-inosina (FABIANI e RONQUIST, 1995; CHU, ZHANG, *et al.*, 2005; ZHANG, LIANG, *et al.*, 2021; TORRES, PEDROSA, *et al.*, 2021). Por fim, o papel da NAM no metabolismo energético é muito mais evidente, já que este metabólito é parte crítica na composição dos dinucleotídeos nicotinamida adenina, NADH e NAD<sup>+</sup> (KANG, HARADA e YAMATOYA, 2020). Em relação à maior presença de guanosina e inosina, vale citar que há pesquisas com outros tipos celulares que demonstram o papel antioxidante destes nucleosídeos, com a redução da presença de EROs, bem como da ação dos mesmos no desvio de produção de energia para a glicólise (JURKOWITZ, LITSKY, *et al.*, 1998; GUDKOV, SHTARKMAN, *et al.*, 2006). Portanto, há necessidade de mais estudos sobre o papel dos mesmos em espermatozoides e em outras espécies de mamíferos. Ademais, há estudos com plasma seminal humano que apresentam resultados contraditórios quanto a maior concentração de inosina, com alguns a associando a grupos com problemas morfológicos e subfertilidade, enquanto outros a grupos com maior fertilidade (FABIANI e RONQUIST, 1995; LAZZARINO, LISTORTI, *et al.*, 2018; ZHANG, LIANG, *et al.*, 2021). De forma geral, a maior presença de vários substratos energéticos nas amostras de baixa fertilidade, chama atenção pelo fato de que o espermatozoide íntegro e viável possui alta relação com seu *status* energético, o qual, por sua vez, depende da capacidade da célula em utilizar tais substratos (HALANGK, BOHNENSACK, *et al.*, 1985; AMARAL, LOURENÇO, *et al.*, 2013; AITKEN e DREVET, 2020).

Quanto aos grupos de alta fertilidade, estes apresentaram maior abundância de xantina, hipoxantina e colina, metabólitos que se encontram entre os maiores valores de *loadings* e *VIP score* na separação dos grupos de alta e baixa fertilidade nas duas raças estudadas. A xantina e hipoxantina são metabólitos formados durante o catabolismo de purinas e, enquanto a xantina é formada pela ação da xantina oxidase sobre a hipoxantina, o inverso também pode ocorrer com a ação da xantina oxirredutase sobre a xantina, resultando em hipoxantina (BARBATO, TALEVI, *et al.*, 2017). Xantina e xantina oxidase são metabólitos pró-oxidativos, participando da formação do ânion superóxido, sendo utilizadas inclusive em estudos recentes de indução de estresse oxidativo para o pré-condicionamento de células espermáticas antes das mesmas serem submetidas à criopreservação (BARBATO, TALEVI, *et al.*, 2017; SHARAFI, ZHANDI, *et al.*, 2019). A maior presença de xantina nas amostras de alta fertilidade poderia ser um indicativo de maior presença de EROs, o que não foi observado, no entanto a preservação da homeostase oxidativa pode ser justificada pelo fato de que estas amostras apresentam uma presença muito maior de hipoxantina, cerca de dez vezes mais, provavelmente devido à maior ação da xantina oxirredutase (SHARAFI, ZHANDI, *et al.*, 2019). Em relação à hipoxantina, como supracitado, a via hipoxantina-inosina pode ser uma fonte intra-mitocondrial alternativa de conversão de AMP à ADP e ATP durante o metabolismo energético (HARMSSEN, DE TOMBE, *et al.*, 1984; CHU, ZHANG, *et al.*, 2005; TORRES, PEDROSA, *et al.*, 2021).

Por fim, a colina é um metabólito precursor na síntese de componentes estruturais das células e de moléculas sinalizadoras. É componente essencial para a síntese de vários lipídios da membrana plasmática, como fosfatidilcolinas, lisofosfatidilcolinas e esfingomiélinas, bem como de acetilcolina e outras moléculas de sinalização, com ação sobre o transporte de proteínas e rearranjo da membrana plasmática, processo de capacitação espermática e o metabolismo do grupo metila, como a redução da homocisteína em metionina (ZEISEL e DA COSTA, 2009). A importância da colina em vários processos fisiológicos do espermatozoide é corroborada por estudos que relacionam, por exemplo, o uso de diluidores a base de colina com a maior viabilidade das células após resfriamento ou congelamento (AGCA, GILMORE, *et al.*, 2002; DELGADO, LESTER e RORIE, 2018; ACHARYA, BURKE e RORIE, 2020). Da mesma forma, estudos que avaliam inibidores da ação da colina demonstram os efeitos deletérios destes nos espermatozoides, com alteração de

estruturas espermáticas e comprometimento do metabolismo e cinética (SASTRY, JANSON e CHATURVEDI, 1981; ZEISEL e DA COSTA, 2009; JOHNSON, LAO, *et al.*, 2012). A maior presença de colina nos grupos de alta fertilidade, considerando-se ainda os resultados funcionais, suporta os estudos acima, indicando efeitos benéficos da sua maior abundância.

### 3.4.6 CONCLUSÃO

Espermatozoides são células altamente compartimentalizadas, com citoplasma reduzido e silenciadas transcricionalmente, mas que ao mesmo tempo possuem alta demanda de energia e dependem de fontes adequadas da mesma para passarem pelo trato reprodutivo das fêmeas, processos de capacitação, reação acrossomal e fertilização do oócito. O seu metabolismo energético envolve uma série de reações de oxidação-redução, com a inevitável e fisiologicamente importante produção de EROs, fazendo com que a sua viabilidade dependa não apenas de um metabolismo eficiente, mas também da sua capacidade de manter a homeostase oxidativa.

Os resultados observados neste estudo demonstraram diferenças entre as raças Angus e Nelore e, especialmente, entre os amostras de touros de alta e baixa fertilidade. Foram observadas, de forma mais crítica, diferenças funcionais e metabólicas entre os grupos Angus de alta e baixa fertilidade. Esta observação pode estar relacionada ao fato dos índices de fertilidade dos Angus selecionados para o experimento apresentarem um delta mais elevado em comparação com o dos grupos da raça Nelore, diferença que pode ter origem também nos genótipo e fenótipo das raças. No entanto, os resultados obtidos possuem forte impacto por ser um estudo com animais de histórico de fertilidade conhecido, com base em um banco de dados sólido, e com um número amostral que supera os demais estudos publicados sobre fertilidade em touros.

Foi demonstrado que a avaliação da subfertilidade em touros no que se refere à análise das células espermáticas deve abranger não apenas análises funcionais ou metabólicas, mas associar as mesmas para que se possa ter uma maior compreensão das vias envolvidas por meio da correlação dos resultados. Estudos publicados anteriormente sobre o metaboloma de várias espécies demonstram a dificuldade na interpretação dos resultados pelo número grande de metabólitos e

sua participação em diferentes vias fisiológicas da célula. No entanto, essa interpretação torna-se mais viável com a informação do *status* funcional das células das amostras analisadas. Os resultados funcionais e metabólicos se corroboram, indicando principalmente alterações na função mitocondrial, quebra da homeostase oxidativa e danos à membrana plasmática nas amostras de baixa fertilidade. Os mesmos levantam ainda a possibilidade do grupo Angus de baixa fertilidade apresentar uma maior porcentagem de células em capacitação e reação acrossomais precoces, o que sugere a realização de um estudo mais profundo por meio das análises de subpopulações e correlação das mesmas com o perfil metabólico. Entre os resultados, é relevante notar que as análises de metabólitos de classes distintas, como lipídios, carnitinas e aminoácidos, e a correlação dos mesmos com o metabolismo energético e *status* oxidativo é fundamental para a maior compreensão de vias alternativas que podem ser utilizadas pela célula espermática para manter a sua viabilidade e potencial fertilizante.

As diferenças observadas no perfil metabólico entre os grupos de alta e baixa fertilidade permitiram ainda, apesar de não ser um dos objetivos deste estudo, a sugestão de potenciais biomarcadores. Entre os metabólitos detectados, vários apresentaram valores elevados de acurácia, sensibilidade e especificidade na identificação dos grupos. Considerando-se o fato da subfertilidade ser multifatorial, os resultados relacionados ao *status* funcional, metabólico e valores de *loadings* e *VIP score* das análises multivariadas na separação dos grupos, estes potenciais biomarcadores podem proporcionar a elaboração de um painel de metabólitos. Este, após a sua validação pode permitir, futuramente, a identificação de touros de alta e baixa fertilidade antes que os mesmos entrem em serviço.

## 4. CAPÍTULO 2

### ANÁLISE LIPIDÔMICA, METABOLÔMICA E DOS ATRIBUTOS ESPERMÁTICOS DE TOUROS COM DIFERENTES PERFIS DE CONGELAÇÃO DE SÊMEN

A aplicação de várias biotécnicas visando o aumento de ganho genético e taxa reprodutiva dos animais depende da criopreservação espermática, a qual apresenta desafios. Estes se devem não apenas pela redução da qualidade espermática pós-descongelamento, mas também pela suscetibilidade que o sêmen de alguns touros tem ao processo de criopreservação. O objetivo dos experimentos deste segundo capítulo é a avaliação de atributos espermáticos do sêmen criopreservado de touros divididos em grupos com maior e menor suscetibilidade ao processo de criopreservação (Experimento 2.1), e a análise do perfil lipídico e metabólico do sêmen *in natura* (plasma seminal e células espermáticas) e criopreservado (células espermáticas) destes animais (Experimento 2.2). A associação destas análises, especialmente em animais de alto mérito genético utilizados em central de coleta de sêmen, pode levantar informações importantes para a obtenção de uma maior eficiência no uso da criopreservação, bem como contribuir para a identificação de vias moleculares relacionadas à maior ou menor suscetibilidade ao processo.

#### 4.1 HIPÓTESE

Existem diferenças no perfil lipídico e metabólico, na funcionalidade bem como no *status* oxidativo dos espermatozoides de touros com diferentes perfis de congelamento.

#### 4.2 OBJETIVOS

- Avaliar a funcionalidade e *status* oxidativo de amostras de diferentes partidas de sêmen após criopreservação em touros (*Bos taurus*, *Bos indicus* e raças resultantes de cruzamento industrial) com perfis de congelamento distintos.
- Analisar e identificar diferenças nos perfis lipídico e metabólico de amostras de diferentes partidas de plasma seminal e células espermáticas *in natura* e após criopreservação em touros (*Bos taurus*, *Bos indicus* e raças resultantes de cruzamento industrial) com perfis de congelamento distintos.

### **4.3 EXPERIMENTO 2.1 - ANÁLISE DOS ATRIBUTOS ESPERMÁTICOS, FUNCIONALIDADE E STATUS OXIDATIVO, DE TOUROS COM DIFERENTES PERFIS DE CONGELAÇÃO DE SÊMEN.**

Neste primeiro experimento foi realizada a avaliação, por meio de análises funcionais e de *status* oxidativo, do sêmen criopreservado de ejaculados de touros com maior e menor suscetibilidade ao processo criopreservação.

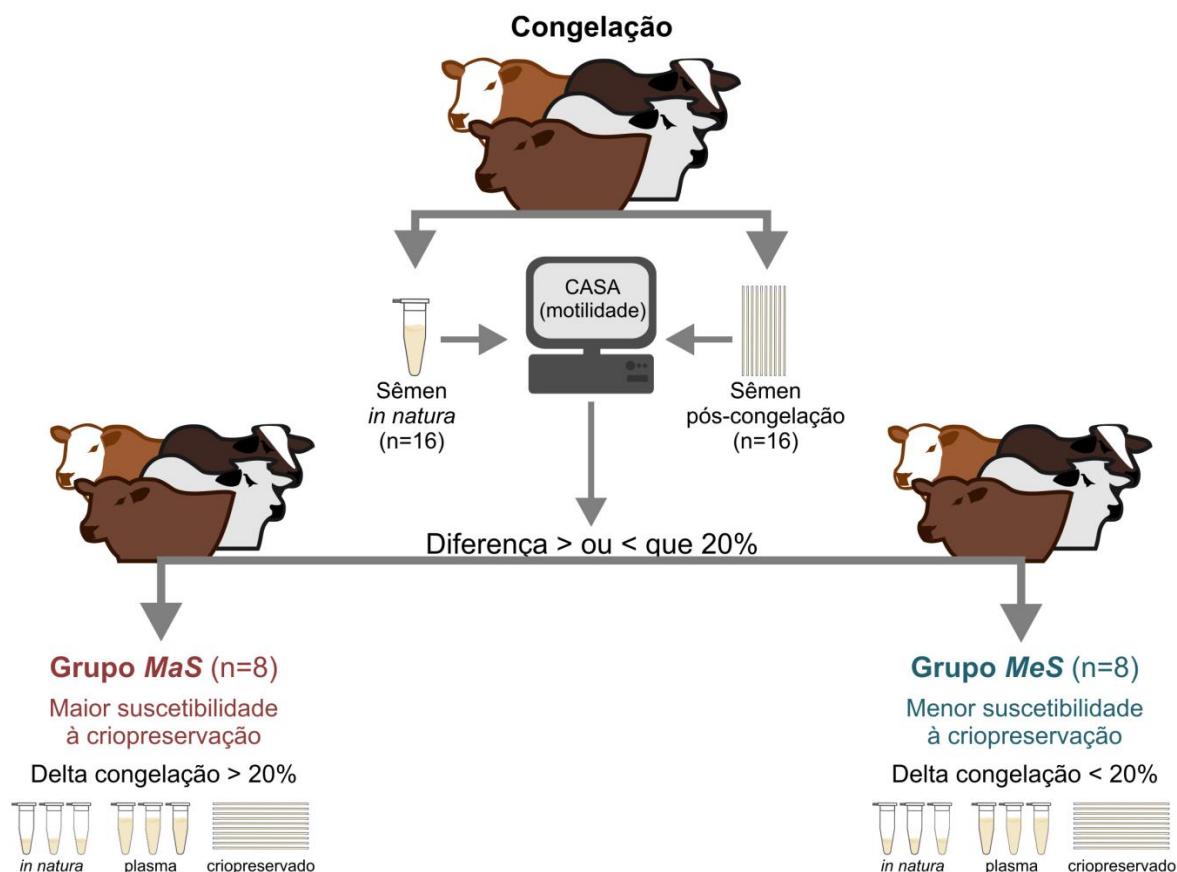
#### **4.3.1 MATERIAL E MÉTODOS**

Este estudo foi conduzido de acordo com as normas éticas para o uso de animais e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, CEUA (protocolo nº 2054100717).

##### **4.3.1.1 Delineamento Experimental**

As amostras de sêmen foram coletadas de touros ( $n=16$ ) *Bos taurus* e *Bos indicus* e raças resultantes de cruzamento industrial, com distribuição homogênea entre os grupos. Hospedados na central de coleta de sêmen (Seleon) sob a mesma condição de manejo, os animais estavam em idade reprodutiva (4 a 8 anos), e não havia diferença significativa em suas taxas de fertilidade. As coletas foram realizadas com vagina artificial e todo o processo de coleta e criopreservação foi realizado na central, seguindo o mesmo protocolo e diluidor. Amostras de sêmen *in natura* foram analisadas imediatamente após a coleta no sistema CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*; Hamilton-Thorne®, Ivos 12.3, USA) para avaliação de motilidade total. Em seguida as mesmas foram submetidas ao processo de criopreservação. Uma palheta de sêmen criopreservado de cada touro foi descongelada e submetida para avaliação no CASA para obtenção dos parâmetros de motilidade pós-descongelação. Os valores de motilidade pré e pós-congelação foram comparados e os animais foram divididos em dois grupos: touros com menor suscetibilidade à criopreservação (*MeS*,  $n=8$ ), os quais apresentaram diferença de motilidade inferior a 20%, e touros com maior suscetibilidade à criopreservação (*MaS*,  $n=8$ ), com diferença superior a 20% (Figura 89). As amostras criopreservadas dos animais dos dois grupos foram analisadas no Experimento 1.2 deste capítulo, para avaliação de atributos espermáticos, funcionalidade e *status* oxidativo pós-descongelação.

Figura 89 - Delineamento experimental do Capítulo II



Fonte: Leite (2022)

Os grupos foram divididos após análise de diferença de motilidade pré e pós-congelamento no sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis; Hamilton-Thorne®, Ivos 12.3, USA) e são apresentados como touros com menor suscetibilidade à criopreservação (*MeS*,  $n=8$ ), os quais apresentaram diferença de motilidade inferior a 20%, e touros com maior suscetibilidade à criopreservação (*MaS*,  $n=8$ ), com diferença superior a 20%.

#### 4.3.1.2. Criopreservação Seminal

As amostras de sêmen foram submetidas à criopreservação na própria central, pelo sistema *one step* (fração única), utilizando-se diluidor a base de gema de ovo de galinha (20%) e glicerol (7%) como crioprotetor. Após a coleta, as amostras de sêmen, mantidas em banho-maria a 37°C, foram diluídas para a concentração de  $80 \times 10^6$  espermatozoides/mL em tubo falcon de 15 mL. Os tubos com as amostras diluídas foram colocados em copos de alumínio com água a 37°C e levados para a câmara fria (IMV®, França) para a curva positiva de congelamento, atingindo 5°C em 1 hora. Após atingirem 5°C, as amostras foram mantidas na câmara fria por mais quatro horas antes de serem envasadas e submetidas à curva negativa. O envase, em palhetas de 0,25 mL (IMV®, França), foi feito na câmara fria utilizando-se o equipamento PACE (Cryo Bio Systems®, IMV®, França). As palhetas

foram distribuídas em prateleiras metálicas e colocadas no freezer de vapor de nitrogênio Digitcool™ (Cryo Bio Systems®, IMV®, França) para a curva negativa (-20°C/min), até atingirem -120°C. Em seguida, foram submersas em nitrogênio líquido, armazenadas em *racks* e mantidas em botijão de nitrogênio líquido.

#### 4.3.1.3. Análises Espermáticas

No momento das análises, as palhetas foram descongeladas por 30 segundos a 37°C em tubo de 1,5 mL, mantido em banho-seco a 37°C. As análises espermáticas realizadas são as mesmas já descritas em detalhes no Capítulo 1, tópico 3.3.2.2. Elas compreendem análise de morfologia espermática (microscopia DIC), análise computadorizada da cinética espermática (CASA), análises funcionais por técnicas de citometria de fluxo e citoquímica (integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, atividade mitocondrial e suscetibilidade a danos de DNA) e avaliação do *status* oxidativo (susceptibilidade à peroxidação lipídica e detecção de espécies reativas de oxigênio).

#### 4.3.1.4. Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados no programa do SAS *System for Windows* (SAS Institute Inc., Cary, NC, E.U.A.) e testados para normalidade de resíduos e homogeneidade das variâncias usando o aplicativo SAS *Guided Data Analysis*. Variáveis que não obedeceram a essas premissas foram transformadas e, desta forma, todos os dados deste experimento se tornaram paramétricos. As diferenças entre os grupos *MeS* e *MaS* foram analisadas utilizando o teste t Student. O nível de significância usado para rejeitar H<sub>0</sub> (hipótese nula) foi de 5%. Os resultados são apresentados em médias (não transformadas) ± erro padrão da média. A análise de correlação foi feita nos dados não transformados pelo teste de Spearman, com classificação por grupo e ranqueamento dos resultados.

### 4.3.2. RESULTADOS

Os resultados observados apontam diferenças importantes entre os grupos quanto à morfologia, padrões de cinética, atividade e potencial de membrana mitocondrial, presença de espécies reativas de oxigênio, integridade de membrana plasmática e suscetibilidade à fragmentação de cromatina (Tabela 41). É importante salientar que mesmo fixando a concentração no momento da diluição pré-



criopreservação, foi realizada a concentração por palheta para garantir que não houve diferença na concentração espermática entre os grupos para que o número de células não influenciasse as demais análises realizadas. Os resultados são apresentados por análise. Tabelas apresentam os resultados em médias  $\pm$  erro padrão da média (SEM) e valores de *P*, enquanto gráficos são apresentados em *boxplot* com média, mediana, espaço interquartil, limites máximo e mínimo e valor de *P*.

Tabela 41 - Resultados das análises espermáticas convencionais e funcionais entre os grupos com maior e menor suscetibilidade ao processo de criopreservação

VARIÁVEL	Maior suscetibilidade à criopreservação (MaS / n=8)	Menor suscetibilidade à criopreservação (MeS / n=8)	<i>P</i>
	Média $\pm$ SEM	Média $\pm$ SEM	
Concentração espermática ( $\times 10^6$ /mL)	70,36 $\pm$ 5,26	68,85 $\pm$ 2,51	0,7167
Defeitos maiores (%)	7,81 $\pm$ 1,62	5,00 $\pm$ 0,75	0,0342
Defeitos menores (%)	6,25 $\pm$ 0,45	4,81 $\pm$ 0,61	0,0799
Defeitos totais (%)	14,06 $\pm$ 1,65	9,81 $\pm$ 1,19	0,0322
Motilidade total (%) (na seleção de grupos)	37,69 $\pm$ 1,82	56,36 $\pm$ 5,75	0,0086
Motilidade progressiva (%) (na seleção de grupos)	25,84 $\pm$ 1,66	39,09 $\pm$ 3,41	0,0112
Motilidade total (%) (momento da análise)	37,00 $\pm$ 2,05	57,38 $\pm$ 4,17	0,0006
Motilidade progressiva (%) (momento da análise)	22,51 $\pm$ 1,27	34,88 $\pm$ 2,66	0,0009
VAP - Velocidade média ( $\mu$ m/s)	95,85 $\pm$ 4,17	98,44 $\pm$ 6,09	0,7310
VSL - Velocidade linear ( $\mu$ m/s)	75,19 $\pm$ 2,66	87,92 $\pm$ 5,60	0,0591
VCL - Velocidade curvilínea ( $\mu$ m/s)	149,92 $\pm$ 6,46	144,50 $\pm$ 8,01	0,6067
ALH - Amplitude do movimento lateral da cabeça ( $\mu$ m)	7,36 $\pm$ 0,19	5,91 $\pm$ 0,18	<,0001
BCF - Frequência de batimento cruzado (Hz)	28,86 $\pm$ 0,84	27,55 $\pm$ 0,77	0,2701
STR - Retilinearidade (%)	78,26 $\pm$ 1,26	89,16 $\pm$ 0,43	<,0001
LIN - Linearidade (%)	50,01 $\pm$ 1,07	60,60 $\pm$ 1,00	<,0001
Velocidade rápida (%)	21,63 $\pm$ 2,45	36,50 $\pm$ 2,04	0,0004
Velocidade média (%)	12,88 $\pm$ 1,03	15,38 $\pm$ 1,28	0,1498
Velocidade lenta (%)	32,38 $\pm$ 1,36	33,75 $\pm$ 2,34	0,6198
Estáticos (%)	33,38 $\pm$ 3,80	14,50 $\pm$ 3,12	0,0018
Atividade mitocondrial alta - DAB Classe I (%)	66,75 $\pm$ 1,63	76,13 $\pm$ 1,37	0,0006
Atividade mitocondrial média - DAB Classe II (%)	20,13 $\pm$ 1,75	13,50 $\pm$ 1,05	0,0058
Atividade mitocondrial baixa - DAB Classe III (%)	5,00 $\pm$ 0,73	3,50 $\pm$ 0,50	0,1127
Ausência de atividade mitocondrial - DAB Classe IV (%)	8,13 $\pm$ 1,26	6,88 $\pm$ 0,88	0,4496
Índice de atividade mitocondrial (%)	78,06 $\pm$ 1,10	83,75 $\pm$ 0,99	0,0018
Potencial de membrana mitocondrial baixo (%)	78,27 $\pm$ 2,14	40,48 $\pm$ 4,71	<,0001
Potencial de membrana mitocondrial médio (%)	7,34 $\pm$ 0,75	21,05 $\pm$ 1,75	<,0001
Potencial de membrana mitocondrial alto (%)	14,39 $\pm$ 1,41	39,48 $\pm$ 3,43	<,0001
EROs+ e membrana Íntegra (%)	15,84 $\pm$ 0,95	6,23 $\pm$ 0,58	<,0001
TBARS (ng de MDA/ $10^6$ espermatozoides)	3,44 $\pm$ 0,13	3,11 $\pm$ 0,13	0,0862
Integridade de membrana acrossomal (%)	50,78 $\pm$ 3,77	57,49 $\pm$ 4,41	0,2663
Integridade de membrana plasmática (%)	20,95 $\pm$ 1,37	42,50 $\pm$ 3,00	<,0001
Suscetibilidade a danos de DNA (%)	0,57 $\pm$ 0,04	0,32 $\pm$ 0,02	<,0001

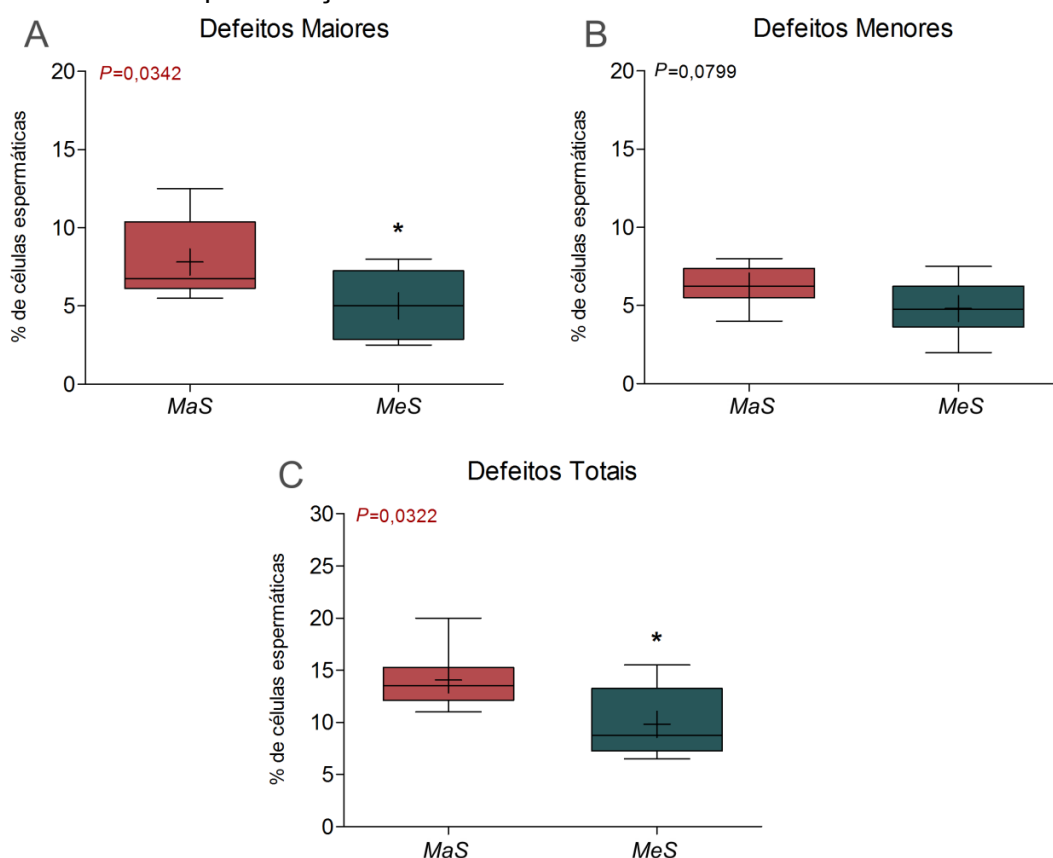
Fonte: Leite (2022)

Resultados em média $\pm$ SEM e valor de *P*. Valores de *P*<0,05, são apresentados em vermelho. Médias $\pm$ SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

### 4.3.2.1 Morfologia espermática

A análise morfológica demonstrou que não houve diferença entre os grupos quanto aos defeitos menores, no entanto, o grupo com maior suscetibilidade à criopreservação (*MaS*) apresentou mais defeitos maiores e, portanto, mais defeitos totais, em comparação com o grupo com menor suscetibilidade (Tabela 41 e Figura 90A e C).

Figura 90 - Gráficos de morfologia espermática dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

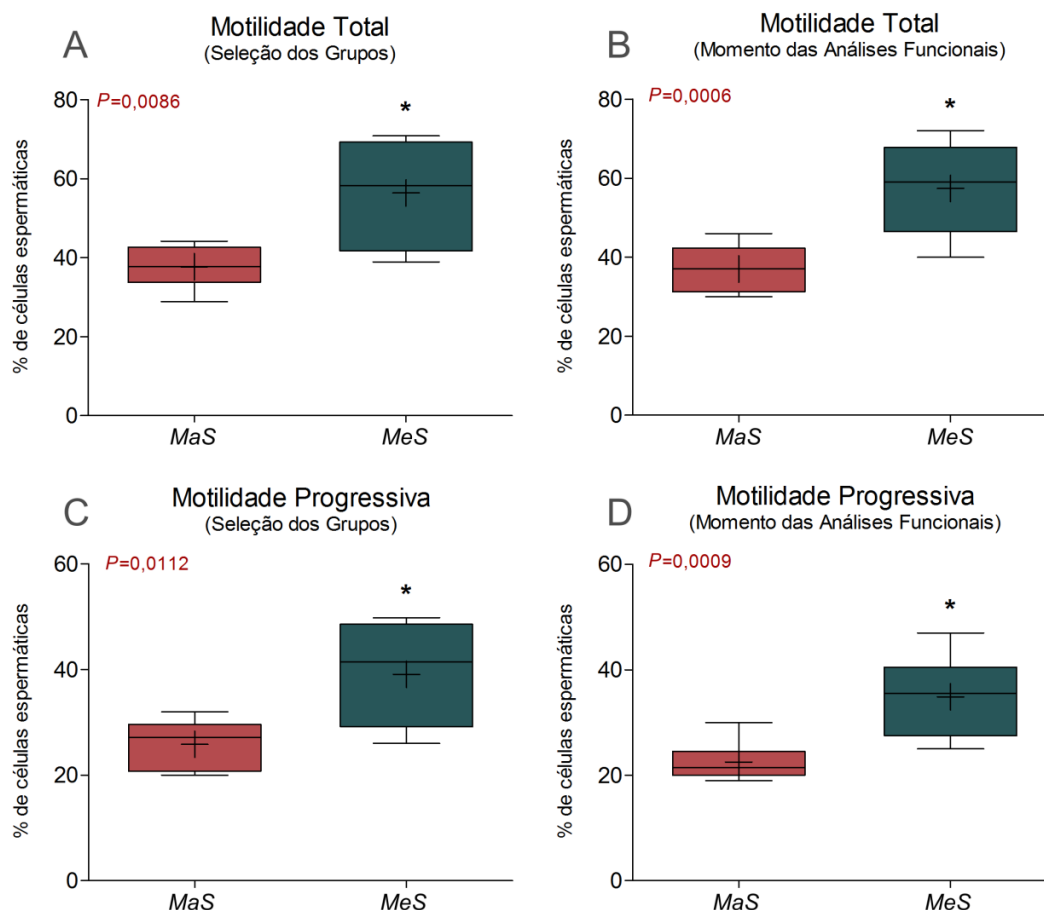
Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartil, limites mínimo e máximo (*whiskers*) e média (+); diferenças entre os grupos são marcadas por \* e o valor de *P* é apresentado próximo ao eixo y. Em A: defeitos maiores; Em B: defeitos menores; em C: defeitos totais.

### 4.3.2.2 Cinética espermática

A diferença de motilidade total entre os grupos, utilizada para a separação dos mesmos, se manteve no momento em que as amostras foram descongeladas para as análises funcionais (Tabela 41 e Figuras 91A e B). O mesmo foi observado para a motilidade progressiva, com maior porcentagem de células com padrão de

movimento progressivo no grupo com menor suscetibilidade à criopreservação (Tabela 41 e Figuras 91C e D).

Figura 91 - Gráficos de cinética espermática com motilidades total e progressiva dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

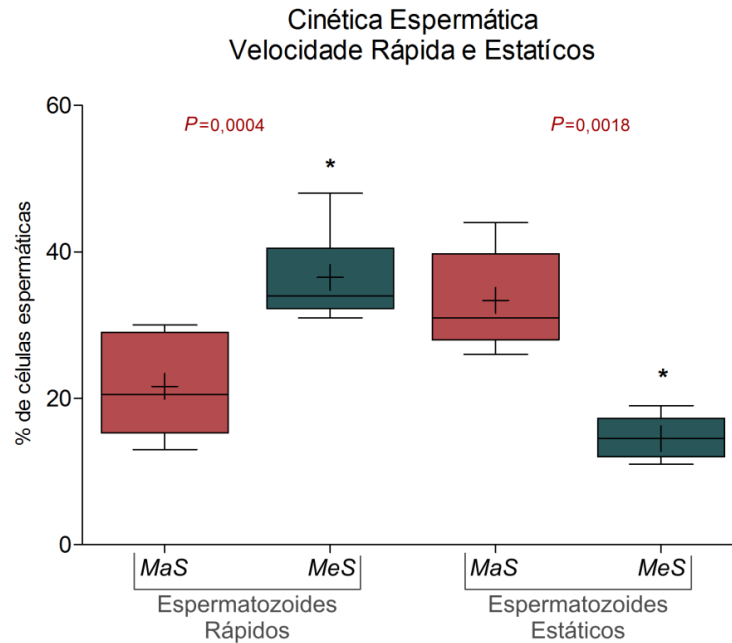


Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartil, limites mínimo e máximo (*whiskers*) e média (+); diferenças entre os grupos são marcadas por \* e o valor de *P* é apresentado próximo ao eixo y. Em A: motilidade total realizada para a separação dos grupos; Em B: motilidade total no momento das análises funcionais; em C: motilidade progressiva na análise feita no momento da separação dos grupos; em D: motilidade progressiva no momento das análises funcionais.

Não houve diferença entre os grupos nos padrões de velocidade espermática média, linear, e curvelinear (Tabela 41). No entanto, foi observada diferença quanto à porcentagem de células rápidas e estáticas, com o grupo com menor suscetibilidade (*MeS*) com mais espermatozoides rápidos e menos espermatozoides estáticos em comparação com o grupo com maior suscetibilidade à criopreservação (*MaS*) (Tabela 41 e Figura 92).

Figura 92 - Gráfico de cinética espermática com padrão de velocidade rápida e espermatozoides estáticos dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

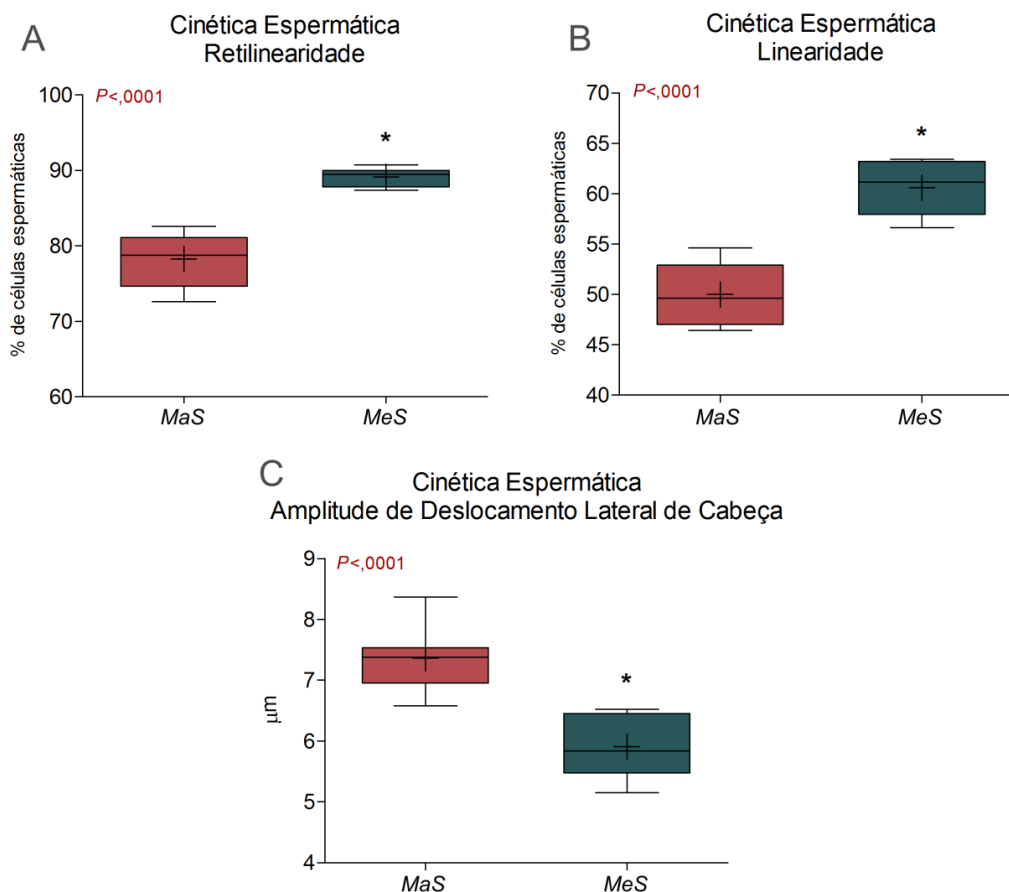


Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartil, limites mínimo e máximo (*whiskers*) e média (+); diferenças entre os grupos são marcadas por \* e o valor de *P* é apresentado acima, entre os grupos.

Uma maior porcentagem de células espermáticas com padrão de retilinearidade e linearidade foi observada no grupo com menor suscetibilidade à criopreservação (Tabela 41 e Figura 93A e B). O grupo com maior suscetibilidade à criopreservação apresentou maior amplitude de deslocamento lateral de cabeça (Tabela 41 e Figura 93C). Não houve diferença entre os grupos em relação à frequência de batimento de flagelos (Tabela 41).

Figura 93 - Gráficos de cinética espermática com retilinearidade, linearidade e ALH dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartil, limites mínimo e máximo (*whiskers*) e média (+); diferenças entre os grupos são marcadas por \* e o valor de *P* é apresentado próximo ao eixo y. Em A: retilinearidade (STR); Em B: linearidade (LIN); em C: amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH).

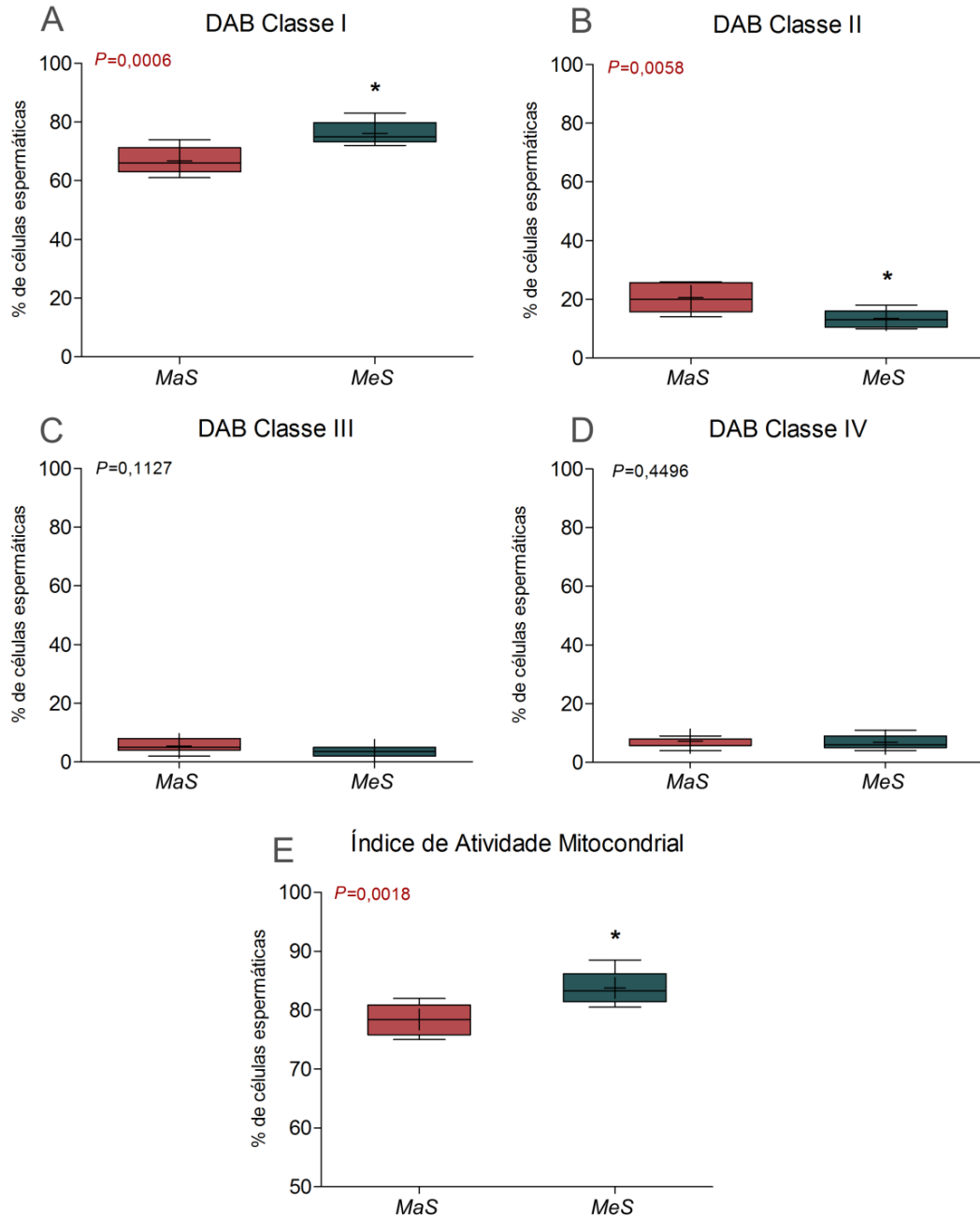
#### 4.3.2.3 Atividade mitocondrial e potencial de membrana mitocondrial

O grupo com menor suscetibilidade à criopreservação teve mais espermatozoides com atividade mitocondrial alta (DAB Classe I) (Tabela 41 e Figura 94A), em comparação com o grupo com maior suscetibilidade, o qual, por sua vez, apresentou mais células com atividade mitocondrial média (DAB Classe II) (Tabela 41 e Figura 94B). Não houve diferença entre os grupos para atividade mitocondrial baixa (DAB Classe III), bem como para ausência de atividade mitocondrial (DAB Classe IV) (Tabela 41 e Figuras 94C e D). Com estes resultados, o grupo MeS apresentou maior índice de atividade mitocondrial que o grupo MaS (Tabela 41 e Figura 94E).

Quanto ao potencial de membrana mitocondrial (PMM), o grupo com menor suscetibilidade à criopreservação teve maior porcentagem de espermatozoides com

PMM alto e médio (Tabela 41 e Figuras 95A e B). O oposto foi observado no grupo com maior suscetibilidade, que apresentou mais espermatozoides com PMM baixo (Tabela 41 e Figura 95C).

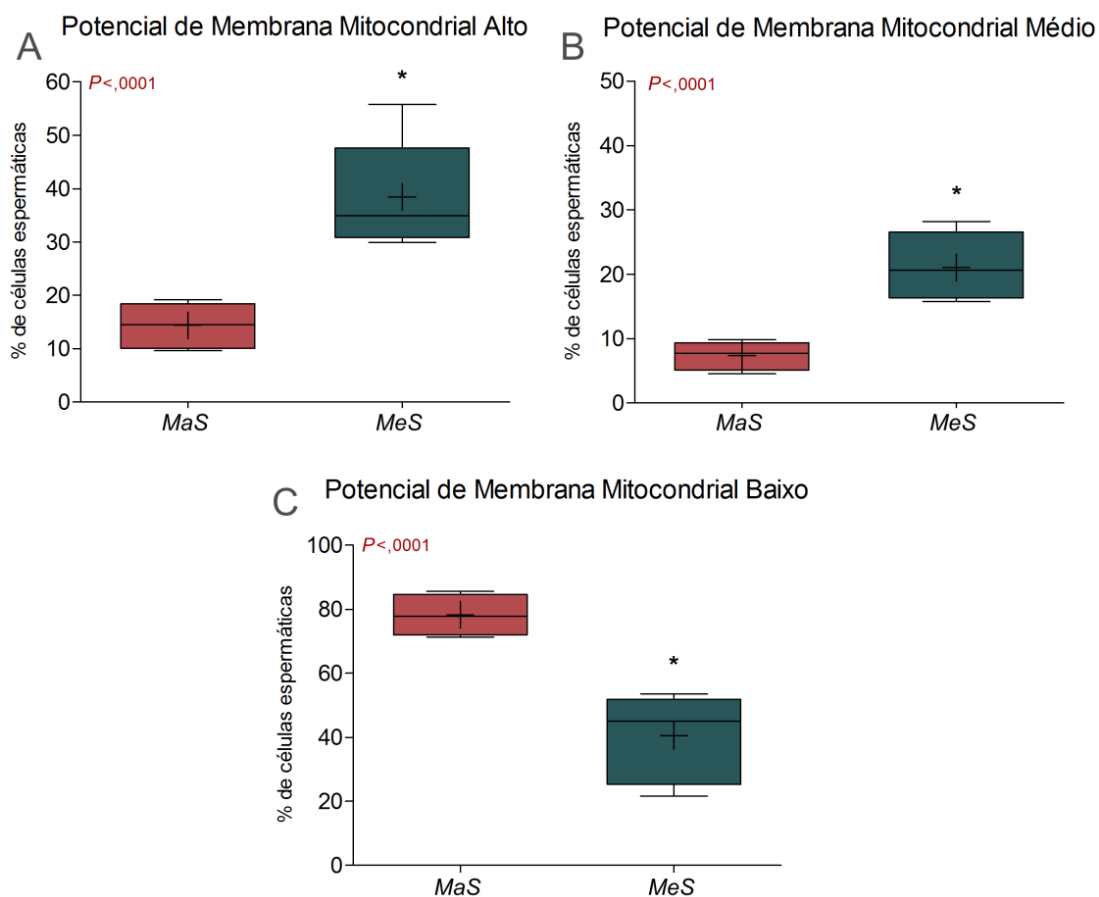
Figura 94 - Gráficos de atividade mitocondrial dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartil, limites mínimo e máximo (*whiskers*) e média (+); diferenças entre os grupos são marcadas por \* e o valor de P é apresentado próximo ao eixo y. Em A: atividade mitocondrial alta (DAB Classe I); Em B: atividade mitocondrial média (DAB Classe II); em C: atividade mitocondrial baixa (DAB Classe III); Em D: ausência de atividade mitocondrial (DAB Classe IV); Em E: índice de atividade mitocondrial.

Figura 95 - Gráficos de potencial de membrana mitocondrial dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



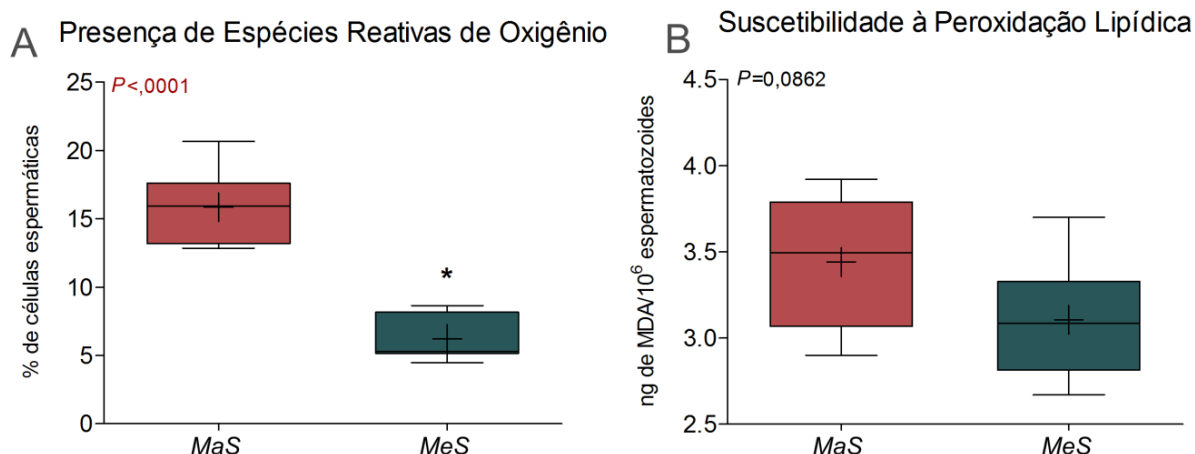
Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartis, limites mínimo e máximo (*whiskers*) e média (+); diferenças entre os grupos são marcadas por \* e o valor de *P* é apresentado próximo ao eixo y. Em A: potencial de membrana mitocondrial alto; Em B: potencial de membrana mitocondrial médio; em C: potencial de membrana mitocondrial baixo.

#### 4.3.2.4 Status oxidativo

Em relação ao *status* oxidativo, uma maior presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi observada no grupo com maior suscetibilidade à criopreservação (Tabela 41 e Figura 96A). No entanto, apesar deste grupo apresentar maior concentração de malondialdeído, não houve diferença entre os grupos quanto à suscetibilidade à peroxidação lipídica (ensaio TBARs) (Tabela 41 e Figura 96B).

Figura 96 - Gráficos de *status* oxidativo dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



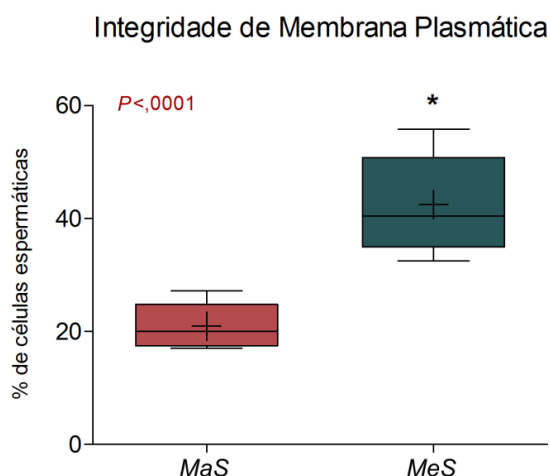
Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartis, limites mínimo e máximo (*whiskers*) e média (+); diferenças entre os grupos são marcadas por \* e o valor de *P* é apresentado próximo ao eixo y. Em A: presença de EROs; Em B: suscetibilidade à peroxidação lipídica.

#### 4.3.2.5 Integridade de membranas plasmática e acrossomal

O grupo com menor suscetibilidade à criopreservação apresentou maior porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra em comparação com o grupo com maior suscetibilidade (Tabela 41 e Figura 97). Não houve, no entanto, diferença entre os grupos no que se refere à integridade de membrana acrossomal (Tabela 41).

Figura 97 - Gráfico de integridade de membrana plasmática dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

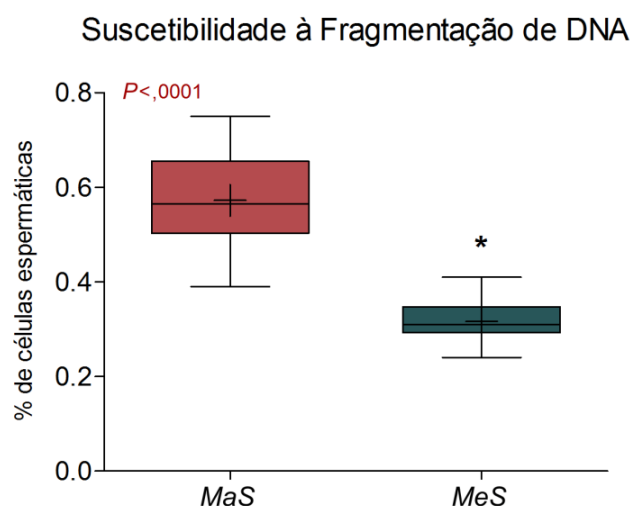
Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartis, limites mínimo e máximo (*whiskers*) e média (+); diferenças entre os grupos são marcadas por \* e o valor de *P* é apresentado próximo ao eixo y.



#### 4.3.2.6 Integridade de DNA

Os resultados do desafio por meio do ensaio da estrutura da cromatina espermática, mostram uma maior suscetibilidade à fragmentação de DNA no grupo com maior suscetibilidade à criopreservação (*MaS*) em comparação com o grupo *MeS* (Tabela 41 e Figura 98).

Figura 98 - Gráfico de suscetibilidade à fragmentação de DNA dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartil, limites mínimo e máximo (*whiskers*) e média (+); diferenças entre os grupos são marcadas por \* e o valor de *P* é apresentado próximo ao eixo y.

#### 4.3.2.7 Análise de correlação

O grupo com menor suscetibilidade à criopreservação (*MeS*), selecionado pela menor redução na motilidade total, apresentou também maior motilidade progressiva, a qual teve correlação positiva com potencial de membrana mitocondrial (PMM) alto ( $r=0,952$ ,  $P=0,0003$ ), que por sua vez apresentou correlação positiva com integridade acrossomal ( $r=0,881$ ,  $P=0,0039$ ) e motilidade total ( $r=0,852$ ,  $P=0,0101$ ) e inversa com atividade mitocondrial baixa ( $r=-0,726$ ,  $P=0,0415$ ). No grupo *MeS*, houve correlação positiva entre índice de atividade mitocondrial e VSL ( $r=0,905$ ,  $P=0,002$ ), VAP ( $r=0,762$ ,  $P=0,028$ ), alta atividade mitocondrial ( $r=0,838$ ,  $P=0,0093$ ) e integridade acrossomal ( $r=0,737$ ,  $P=0,0366$ ). Na cinética espermática, o grupo *MeS*, apresentou ainda correlação positiva entre linearidade e retilinearidade ( $r=0,957$ ,  $P=0,0002$ ) e, correlação inversa das duas variáveis com suscetibilidade à fragmentação de DNA (LIN:  $r=-0,671$ ,  $P=0,0485$ ; STR:  $r=-0,827$ ,  $P=0,0113$ ) e

atividade mitocondrial média (LIN:  $r=-0.755$ ,  $P=0.0304$ ; STR:  $r=-0.730$ ,  $P=0.0398$ ). Houve ainda correlação de variáveis de *status* oxidativo com variáveis cinéticas no grupo *MeS*, com correlação inversa entre EROs e espermatozoides rápidos ( $r=-0.790$ ,  $P=0.0195$ ) e entre suscetibilidade à peroxidação lipídica e motilidade total ( $r=-0.786$ ,  $P=0.0208$ ) e progressiva ( $r=-0.714$ ,  $P=0.0465$ ). Por fim, o grupo apresentou correlação positiva entre integridade de membrana plasmática e integridade acrossomal ( $r=0.738$ ,  $P=0.0366$ ), e correlação inversa dessas duas variáveis com espermatozoides estáticos ( $r=-0.735$ ,  $P=0.0378$  e  $r=-0.771$ ,  $P=0.0251$ , respectivamente).

Quanto ao grupo com maior suscetibilidade à criopreservação (*MaS*), além de apresentar maior presença de EROs e suscetibilidade à fragmentação de DNA, foi observada uma correlação positiva entre estas variáveis ( $r=0.707$ ;  $P=0.0471$ ), bem como entre as mesmas e ausência de atividade mitocondrial (EROs:  $r=0.846$ ,  $P=0.0082$ ; DNA:  $r=0.713$ ,  $P=0.0469$ ). A ausência de atividade mitocondrial, por sua vez, teve correlação positiva com espermatozoides estáticos ( $r=0.796$ ,  $P=0.0182$ ). Em relação à função mitocondrial, o grupo apresentou também correlação positiva entre PMM médio e atividade mitocondrial baixa ( $r=0.729$ ,  $P=0.0402$ ). Nas variáveis de cinética, as amostras do grupo *MaS* apresentaram correlação inversa entre motilidade progressiva ( $r=-0.639$ ,  $P=0.0483$ ) e defeitos maiores e entre ALH e maior suscetibilidade à peroxidação lipídica ( $r=0.863$ ,  $P=0.0059$ ). Nesta última, houve correlação inversa com BCF ( $r=-0.857$ ,  $P=0.0065$ ) e integridade acrossomal ( $r=-0.691$ ,  $P=0.048$ ). No grupo *MaS*, houve ainda correlação inversa entre integridade de membranas plasmática e acrossomal e defeitos maiores ( $r=-0.803$ ,  $P=0.0164$  e  $r=-0.766$ ,  $P=0.0267$ , respectivamente). Os quadros completos de correlação dos dados funcionais por grupo estão disponíveis no Apêndice 5.

### 4.3.3 DISCUSSÃO

As células espermáticas de bovinos, apesar de consideradas umas das mais resistentes ao processo de criopreservação, são afetadas por uma menor viabilidade pós-descongelamento (BATELLIER, VIDAMENT, *et al.*, 2001; BAILEY, MORRIE e CORMIER, 2003; GRAHAM e MOCÉ, 2005). É importante salientar que o processo de criopreservação é composto de várias etapas, como diluição e adição de crioprotetores, resfriamento, congelamento e armazenagem e, no momento do uso das palhetas de sêmen, descongelamento (HOLT, 2000; PETRUNKINA, 2007). Este

processo de congelação e descongelação, apesar dos avanços observados na técnica, causa grande estresse em uma parte considerável das células de um ejaculado, com danos às estruturas espermáticas e, conseqüentemente, ao seu *status* funcional (COLLIN, SIRARD, *et al.*, 2000; BAILEY, MORRIE e CORMIER, 2003; LAYEK, MOHANTY, *et al.*, 2016).

Danos causados pela criopreservação, por estresse mecânico, devido aos efeitos de temperatura, osmótico e oxidativo, desencadeiam uma série de efeitos que podem ser prejudiciais às diferentes estruturas das células espermáticas, afetando, conseqüentemente, a sua motilidade (O'CONNELL, MCCLURE e LEWIS, 2002; OZKAVUKCU, ERDEMLI, *et al.*, 2008; SHOJAEI, KROETSCH, *et al.*, 2012). Levando em consideração que a motilidade espermática é fundamental para a função dos espermatozoides e afetada por danos estruturais aos mesmos, bem como que parte das células de um ejaculado possui maior ou menor suscetibilidade a estes danos, o presente estudo utilizou a motilidade total pré e pós-congelação, avaliada pelo sistema CASA, para determinar os grupos considerados com maior e menor suscetibilidade ao processo de criopreservação.

Entre os resultados de cinética espermática, o grupo com maior suscetibilidade à criopreservação apresentou menor porcentagem de células com motilidade progressiva, rápidas e com padrões de retilinearidade e linearidade. Foi observado ainda no mesmo grupo, maior amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH) e maior porcentagem de células estáticas. Apesar de não haver diferença entre os grupos nos padrões de velocidade (VAP, VSL e VCL), tais resultados corroboram estudos anteriores que demonstraram a queda de parâmetros cinéticos pós-criopreservação em espermatozoides bovinos e outras espécies (CRITSER, ARNESON, *et al.*, 1987; HOLT, MORRIS, *et al.*, 1988; LEFFLER e WALTERS, 1996; HOLT, 2000; O'CONNELL, MCCLURE e LEWIS, 2002; CELEGHINI, DE ARRUDA, *et al.*, 2008; UNDERWOOD, BATHGATE, *et al.*, 2009; BÜYÜKLEBLEBICI, TUNCER, *et al.*, 2014), incluindo ainda a exceção observada para o ALH (O'CONNELL, MCCLURE e LEWIS, 2002). O fato do grupo com maior suscetibilidade à criopreservação ter apresentado maior ALH associado a uma menor linearidade em uma maior porcentagem de células, levanta a possibilidade de que uma parte dos espermatozoides deste grupo tenha entrado em processo de hiperativação e capacitação precoces, devido ao fenômeno conhecido como criocapacitação (BAILEY, BILODEAU e CORMIER, 2000; BAILEY, MORRIE e

CORMIER, 2003; SHOJAEI, KROETSCH, *et al.*, 2012). É importante salientar que espermatozoides em processo de capacitação possuem maior fragilidade decorrente de alterações na composição das membranas plasmática e acrossomal e, portanto, são mais suscetíveis a danos estruturais e funcionais (BAILEY, BILODEAU e CORMIER, 2000; AITKEN e CURRY, 2011).

Os estudos citados acima correlacionando a queda de parâmetros cinéticos a danos estruturais nos espermatozoides durante o processo de criopreservação, observam principalmente danos à membrana plasmática e função mitocondrial, bem como condições patológicas de flagelos e cabeça (O'CONNELL, MCCLURE e LEWIS, 2002; BÜYÜKLEBLEBICI, TUNCER, *et al.*, 2014; AITKEN, 2017). De fato, defeitos maiores foram observados em uma maior porcentagem de células do grupo com maior suscetibilidade à criopreservação, mesmo que dentro do padrão considerado aceitável para bovinos. É importante observar, no entanto, que neste grupo houve correlação inversa de defeitos maiores com integridade de membranas plasmática e acrossomal.

Quanto aos danos à membrana plasmática e função mitocondrial, vale destacar que as membranas plasmáticas e mitocondriais são interdependentes e igualmente vulneráveis ao processo de criopreservação (O'CONNELL, MCCLURE e LEWIS, 2002; CELEGHINI, DE ARRUDA, *et al.*, 2008). A mitocôndria possui papel essencial no metabolismo das células espermáticas, sendo a sua principal fonte de energia oxidativa pela produção de ATP via cadeia de transporte de elétrons, constituindo o principal sítio de formação de EROs intracelular (NICHI, BOLS, *et al.*, 2006; AITKEN e CURRY, 2011; LOSANO, ANGRIMANI, *et al.*, 2018). Portanto, danos à membrana mitocondrial e seu funcionamento podem afetar a homeostase oxidativa das células espermáticas, com liberação excessiva de EROs, o que, por sua vez, pode desencadear novos danos às estruturas espermáticas (GALLON, MARCHETTI, *et al.*, 2006; KOPPERS, DE IULIIS, *et al.*, 2008; AMARAL, LOURENÇO, *et al.*, 2013; GUALTIERI, KALTHUR, *et al.*, 2021). Os resultados do presente estudo mostram que o grupo com menor suscetibilidade à criopreservação apresentou maior índice de atividade mitocondrial (mais células com alta atividade) associado a potencial de membrana mitocondrial alto e médio, indicando que uma maior porcentagem de células deste grupo não apresenta disfunções mitocondriais. Corroborando esta observação, o grupo apresentou ainda uma correlação positiva entre alto PMM e motilidade progressiva, menor presença de EROs, bem como

correlação inversa entre espermatozoides rápidos e presença de EROs. Em contrapartida, o grupo com maior suscetibilidade à criopreservação apresentou menor índice de atividade mitocondrial (menos células com atividade alta e mais células com atividade média) associado a um potencial de membrana mitocondrial baixo, indicando a presença de uma maior porcentagem de células espermáticas com problemas mitocondriais. Estudos recentes com sêmen bovino criopreservado demonstram que a disfunção mitocondrial está associada a um aumento da permeabilidade e redução do potencial de membrana mitocondrial, com consequente redução na produção de ATP e aumento nos níveis de EROs (AITKEN e DREVET, 2020; GUALTIERI, KALTHUR, *et al.*, 2021).

O impacto da disfunção mitocondrial na homeostase oxidativa foi observado no grupo com maior suscetibilidade à criopreservação, que apresentou maior presença de EROs. Vale salientar que, em situações em que o funcionamento mitocondrial é comprometido, a toxicidade gerada é prejudicial não apenas ao espermatozoide afetado, mas também aos que estão em sua proximidade (KOPPERS, DE IULIIS, *et al.*, 2008; LAYEK, MOHANTY, *et al.*, 2016; LOSANO, ANGRIMANI, *et al.*, 2017). As células espermáticas possuem um sistema natural de proteção contra um aumento na produção de EROs, no entanto, este é insuficiente para proteger o espermatozoide contra o estresse oxidativo mediado pelo processo de criopreservação, o qual leva ainda a uma redução nos níveis de antioxidantes presentes no espermatozoide, como superóxido dismutase (SOD) e glutatona (GSH), (BILODEAU, CHATTERJEE, *et al.*, 2000; NICHII, BOLS, *et al.*, 2006; BÜYÜKLEBLEBICI, TUNCER, *et al.*, 2014). Não obstante, os danos induzidos ao espermatozoide durante a criopreservação e descongelação serem multifatoriais, o estresse oxidativo é um fator significativo, considerando-se a menor defesa antioxidante dos mesmos (AGARWAL, VIRK, *et al.*, 2014; KUMAR, PRASAD, *et al.*, 2019).

O excesso de EROs leva à peroxidação lipídica, que por sua vez leva à formação de vários subprodutos tóxicos, como hidroperóxidos lipídicos, alcadienos conjugados e, principalmente o malondialdeído (MDA) (NICHII, GOOVAERTS, *et al.*, 2007; KUMAR, PRASAD, *et al.*, 2019). Os espermatozoides, por conter alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), são altamente suscetíveis à peroxidação lipídica, que, por sua vez, leva à perda de integridade de membranas, alterações metabólicas, perda de motilidade e alterações moleculares em lipídeos,

carboidratos, proteínas e fragmentação do DNA (SARIÖZKAN, BUCAK, *et al.*, 2009; SIMÕES, FEITOSA, *et al.*, 2013; SLIMEN, NAJAR, *et al.*, 2016; AITKEN e DREVET, 2020). Não houve diferença entre os grupos estudados quanto à análise de suscetibilidade à peroxidação lipídica, a qual mede, sob estresse induzido, a presença de MDA. Entretanto, os resultados indicam uma tendência de maior presença de MDA sob estresse induzido no grupo com maior suscetibilidade à criopreservação ( $P=0,0862$ ), a qual, juntamente com a maior presença de EROs, podem configurar um quadro de estresse oxidativo com o consequente agravamento de danos causados às estruturas funcionais dos espermatozoides deste grupo.

De fato, os resultados aqui apresentados mostram que o grupo com maior suscetibilidade à criopreservação teve menor porcentagem de células com integridade de membrana plasmática. Os danos de membrana podem ter sido causados pelo estresse mecânico (de temperatura e osmóticos) durante o processo de criopreservação (O'CONNELL, MCCLURE e LEWIS, 2002; LAYEK, MOHANTY, *et al.*, 2016), bem como pela ação de EROs. No entanto, o estresse oxidativo contribui para o agravamento destes danos com alterações na composição molecular da membrana e perda de permeabilidade seletiva, com o efluxo de colesterol, influxo de cálcio e perda de enzimas, por exemplo (JANUSKAUSKAS, JOHANNISSON e RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2003; GADELLA, 2008; KUMAR, PRASAD, *et al.*, 2019). Além disso, o espermatozoide não possui a capacidade de síntese de componentes de sua membrana, cuja composição, relacionada à funções específicas pela presença de micro-domínios, possui papel fundamental em vários de seus eventos fisiológicos (FLESH e GADELLA, 2000; WASSALL e STILLWELL, 2009; ARGOV-ARGAMAN, MAHGREFTHE, *et al.*, 2013).

A menor integridade e alteração de composição molecular da membrana plasmática, associada à produção excessiva de EROs, podem levar ainda ao comprometimento da integridade do DNA pela fragmentação da cromatina (AITKEN e CURRY, 2011; SIMÕES, FEITOSA, *et al.*, 2013; LE, NGUYEN, *et al.*, 2019). No presente estudo, o grupo com maior suscetibilidade à criopreservação apresentou também maior suscetibilidade à fragmentação de DNA e houve correlação positiva entre esta variável e presença de EROs. Alterações na integridade da cromatina e, portanto, do genoma contido no espermatozoide, comprometem a função primordial do espermatozoide de entregar o DNA paterno e a sua informação epigenética ao óócito (UGUR, SABER ABDELRAHMAN, *et al.*, 2019; AITKEN e DREVET, 2020).

Os resultados funcionais e de *status* oxidativo aqui observados são corroborados por vários estudos, aqui citados, sobre os efeitos da criopreservação. Eles demonstram ainda que a seleção dos grupos com maior e menor suscetibilidade a este processo, utilizada neste estudo, foi efetiva, fato fundamental para as avaliações moleculares das vias envolvidas na fisiologia das células espermáticas e mecanismos relacionados ao comprometimento da estrutura funcional das mesmas. Desde os primeiros estudos que observaram a queda da qualidade espermática pós-descongelamento, novas abordagens para a criopreservação de sêmen são continuamente avaliadas e aplicadas. Apesar das técnicas mais convencionais de criopreservação serem ainda muito utilizadas, vários avanços são feitos continuamente. Estes analisam, por exemplo, a adição de antioxidantes, redutores ou de diferentes crioprotetores em diluidores, uso de moléculas para o desacoplamento mitocondrial durante a criopreservação e, até mesmo, a aplicação de técnicas de pré-condicionamento das células espermáticas ao estresse oxidativo sub-letal (CALDEIRA DA SILVA, CERQUEIRA, *et al.*, 2008; CELEGHINI, DE ARRUDA, *et al.*, 2008; SARIÖZKAN, BUCAK, *et al.*, 2009; LAYEK, MOHANTY, *et al.*, 2016; LOSANO, ANGRIMANI, *et al.*, 2017; KUMAR, PRASAD, *et al.*, 2019; UGUR, SABER ABDELRAHMAN, *et al.*, 2019; KHOSROZADEH, KARIMI, *et al.*, 2021).

Considerando-se a importância da criopreservação nas biotécnicas reprodutivas, visando ganhos de produção, estudos constantes são importantes principalmente para a melhor compreensão e até definição do conceito de “bons e maus congeladores”. Um fator importante a ser considerado é que, mesmo em um animal considerado “mau congelador” não são todas as células de um ejaculado que são suscetíveis ao processo de criopreservação, mas sim subpopulações que têm potencial de afetar em maior ou menor grau o ejaculado. Portanto, há necessidade de um maior conhecimento do perfil funcional associado ao molecular de animais com maior suscetibilidade à criopreservação, não apenas para uma futura identificação dos mesmos, mas também para refinar a aplicação de soluções para o problema.

#### **4.4 - EXPERIMENTO 2.2 - ANÁLISE LIPIDÔMICA E METABOLÔMICA DE TOUROS DE TOUROS COM DIFERENTES PERFIS DE CONGELAÇÃO DE SÊMEN.**

Os resultados do Experimento 2.1, realizados em amostras criopreservadas de touros com maior e menor suscetibilidade ao processo de criopreservação, são base importante para as análises lipidômica e metabólica. Neste experimento, as análises foram realizadas nas amostras pré-congelação (plasma seminal e células espermáticas *in natura*) e pós-congelação (sêmen criopreservado) e para uma melhor compreensão dos mecanismos relacionados à maior e menor suscetibilidade de espermatozoides ao processo de criopreservação, bem como de mecanismos relacionados com a redução da qualidade seminal pós-descongelação.

##### **4.4.1 MATERIAL E MÉTODOS**

Este estudo foi conduzido de acordo com as normas éticas para o uso de animais e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, CEUA (protocolo nº 2054100717).

##### **4.4.1.1 Delineamento Experimental**

O delineamento deste segundo experimento é o mesmo descrito no item 4.3.1.1 (Figura 89), no entanto, foram incluídas as amostras pré-congelação (plasma seminal e células espermáticas *in natura*) coletadas no mesmo dia em que foi feita a seleção dos grupos e congelação do sêmen. As amostras de sêmen *in natura* com espermatozoides e plasma seminal foram separadas em alíquotas de 2 mL e armazenadas em criotubos logo após a coleta e mantidas a -80°C até o momento do preparo das mesmas para a análise. O *n* amostral foi o mesmo do experimento 2.1, com um total de 24 amostras (plasma, *n*=8; células de sêmen *in natura*, *n*=8; células de sêmen criopreservado, *n*=8) em cada grupo, maior suscetibilidade à criopreservação (*MaS*) e menor suscetibilidade à criopreservação (*MeS*), com análise molecular de um total de 48 amostras.

##### **4.4.1.2 Análises Moleculares**

As análises moleculares foram realizadas por meio de parceria entre o Laboratório de Andrologia do Departamento de Reprodução Animal – FMVZ USP e o laboratório de análises moleculares da *startup* IonMedicine, externa à USP (Anexo



2) e com o laboratório do Centro de Espectrometria de Massas Aplicada - CEMSA. A menos que indicado, os reagentes usados nas análises deste estudo foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, E.U.A.).

#### **4.4.1.2.1 Preparação das amostras**

As amostras de sêmen criopreservado foram submetidas ao protocolo descrito no item 3.4.1.2.1. As amostras pré-congelação (*in natura*) foram colocadas em microtubos de 2 mL e fundo cônico e submetidos à centrifugação a 37°C, 3000G por 10 min para separação entre plasma seminal e células espermáticas. O plasma seminal (sobrenadante) foi recuperado e separado em replicatas com alíquotas de 200 µL em microtubos de 500 µL. O *pellet* de espermatozoides foi ressuscitado em 1,9 mL de PBS para lavagem por meio de nova centrifugação (3000G por 5 min), visando remover quaisquer resquícios do plasma seminal. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de espermatozoides mantido em microtubo em banho seco a 37°C. Após a leitura da concentração final do *pellet*, cada amostra foi separada em três replicatas com concentração final fixa de  $3 \times 10^6$  espermatozoides e volume fixo de 200 µL de PBS, mantidas em microtubos de 500 µL. As replicatas foram submetidas ainda ao protocolo para lise das células espermáticas por meio de *snap-freezing* (conforme descrito no item 3.4.1.2.1). Ao final do processo as alíquotas das amostras (plasma seminal, células espermáticas *in natura* e criopreservadas) foram armazenadas a -80°C até o momento da extração de lipídios e metabólitos.

#### **4.4.1.2.2. Extração lipídica e de metabólitos**

A extração de lipídios e metabólitos foi realizada conforme descrito no item 3.4.1.2.2, com a utilização das alíquotas com  $3 \times 10^6$  espermatozoides e volume fixo de 200 µL de PBS para as análises de células espermáticas (*in natura* e criopreservadas) e de alíquotas de 200 µL nas análises de plasma seminal.

#### **4.4.1.2.3 Análise do perfil lipídico e metabólico de espermatozoides**

A análise dos perfis lipídico e metabólico das amostras de plasma seminal e células espermáticas pré-congelação e pós-congelação foi realizada conforme descrito no item 3.4.1.2.3.

#### 4.4.1.2.4 Análise Estatística

Os dados de espectrometria obtidos pelo método *target*, que permitem uma análise quantitativa dos metabólitos analisados, foram, inicialmente, normalizados pelo padrão interno deuterado (PID). Esta normalização foi feita pela média das áreas das amostras controle contendo PBS, solução de extração e mix de padrões internos específicos para os metabólitos de cada método analisado. Após a normalização, os resultados de cada metabólito foram quantificados, com a conversão em valores absolutos em ng/mL, a partir da concentração em ng/mL dos PID (para carnitinas, lipídios, mediadores lipídicos e parte de metabólitos primários). Metabólitos analisados sem PID próprio, tiveram as áreas dos picos normalizadas pela área de outro PID (Sulfona de metionina para aminoácidos e Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico – 2NMES, para outros metabólitos primários), com os resultados sendo apresentados em *area ratio*.

Os resultados das análises, em ng/mL ou *area ratio*, foram primeiramente analisados pelo programa do SAS *System for Windows* (SAS Institute Inc., Cary, NC, E.U.A.) e testados para normalidade de resíduos e homogeneidade das variâncias usando o aplicativo SAS *Guided Data Analysis*. Variáveis que não obedeceram a essas premissas foram transformadas e, desta forma, todos os dados deste experimento se tornaram paramétricos. As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando o teste t Student, com a comparação entre os resultados de plasma seminal, células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado entre os grupos *MeS* e *MaS*, bem como entre células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado, pré e pós-congelação, dentro de cada grupo. O nível de significância usado para rejeitar H<sub>0</sub> (hipótese nula) foi de 5%. Os resultados são apresentados em médias (não transformadas) ± erro padrão da média.

A análise de componentes principais (PCA) foi realizada pelo programa Past 4.0 (HAMMER, HARPER e AND RYAN, 2001) para verificação de diferenças globais entre os grupos e identificação de variáveis com maior contribuição significativa, considerando-se valores de *loadings*. Como já citado, *loadings* maiores (positivos ou negativos) indicam que uma variável tem um forte efeito naquele componente principal, enquanto valores positivos e negativos indicam que uma variável e um componente principal estão positivamente ou inversamente correlacionados, respectivamente. Os dados foram previamente normalizados por log e escala centralizada pela média. Análises complementares de *fold change* e correlação

foram realizadas na seleção de variáveis submetidas à PCA. A PCA foi realizada com uma pré-seleção de variáveis pelos seus valores de *loading*, levando-se em consideração ainda o *n* amostral e a quantidade de variáveis analisadas. Os resultados são apresentados por classe de metabólitos e tipo de amostra biológica (plasma seminal, células de sêmen *in natura* e criopreservado) em gráfico PCA-*bitplot* (amostras e variáveis) com escala *eigenvalue*, o qual indica importância das principais variáveis nos grupos analisados.

#### 4.4.2 RESULTADOS

Os resultados são apresentados por classe de metabólitos. Em cada classe há tabelas com resultados para as comparações entre os grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação para amostras de plasma seminal, células espermáticas de sêmen *in natura*, criopreservado e tabelas com os resultados relacionados ao tempo pré e pós-congelação de cada grupo. Todos os resultados de diferenças entre os grupos são apresentados em tabelas com média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) e valores de *P*. Considerando-se a quantidade de comparações entre os grupos para cada metabólito e para permitir o agrupamento das diferentes amostras biológicas, os gráficos são apresentados agrupados com as diferentes análises realizadas, em barra, com média e erro padrão da média (SEM) e valor de *P*. No entanto, devido ao volume de resultados, apenas metabólitos selecionados são apresentados em gráficos. Os resultados de PCA são apresentados em gráfico *biplot*. As tabelas com a porcentagem de variância dos componentes principais e valores de *loadings* estão disponíveis no Apêndice 6. Informações utilizadas na descrição dos metabólitos nos resultados abaixo, foram obtidas nos bancos de dados do PubChem (KIM, CHEN J, *et al.*, 2021) e DAVID (HUANG, SHERMAN e LEMPICKI, 2009; HUANG, SHERMAN e LEMPICKI, 2009).

#### 4.4.2.1 Lipídios

Entre o total de 53 lipídios analisados pelo método target (12 metabólitos de cadeias de ácidos graxos e 41 lipídios abrangendo as classes de esfingosinas, esfingomielinas, lisofosfatidilcolinas, glicerofosfocolinas e fosfatidilcolinas e colesterol), 30 lipídios foram detectados na análise de HPLC-MS/MS no plasma seminal e 26 em células espermáticas (*in natura* e criopreservadas). Os resultados são apresentados abaixo em dois tópicos distintos.

##### 4.4.2.1.1 Diferenças entre os grupos

A comparação entre os grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação na análise do plasma seminal, indica diferença entre apenas cinco dos 30 lipídios detectados (Tabela 42). Em todos os lipídios em que houve diferença, foi observada maior concentração no grupo com menor suscetibilidade à criopreservação (MeS). As diferenças ocorreram nos seguintes lipídios: esfingosina Sph(d16:0) (Tabela 42 e Figura 101); esfingomielinas SM(d18:1/16:1) e SM(d18:1/24:0) (Tabela 42 e Figura 102); lisofosfatidilcolina LPC(24:0), que foi detectada apenas no plasma seminal (Tabela 42); e fosfatidilcolina PC(18:1(9Z)/14:0) (Tabela 42 e Figura 105). Além da LPC(24:0), apesar de não haver diferença entre os grupos, LPC(22:0), SM(d18:1/18:1(9Z)) e PC(19:0/19:0) também foram detectadas apenas no plasma seminal.

Tabela 42 - Resultados de lipídios analisados em plasma seminal dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

Classe	Lipídios Concentração (ng/mL)	Plasma Seminal		P
		Maior suscetibilidade à criopreservação (MaS / n=8)	Menor Suscetibilidade à criopreservação (MeS / n=8)	
		Média±SEM	Média±SEM	
Esterol	Colesterol	69202,50±2494,91	72927,50±2680,45	0,3263
Ácido graxo	Ácido docosahexaenóico (DHA)	4611,94±277,18	4373,92±624,38	0,735
Esfingosina	Sph(d16:0)	28,41±1,93	46,25±6,84	0,006
Esfingomielina	SM(d18:1/16:1)	486,50±35,89	777,53±28,37	<,0001
Esfingomielina	SM(d18:1/16:0)	66885,65±5989,03	88030,09±8043,87	0,0535
Esfingomielina	SM(d18:1/18:0)	76839,87±3675,25	77638,69±3894,51	0,8835
Esfingomielina	SM(d18:1/18:1(9Z))	483,39±35,75	455,77±37,72	0,5608
Esfingomielina	SM(d18:1/24:0)	49646,01±3114,07	59270,37±3015,91	0,0434
Esfingomielina	SM(d18:1/24:1(15Z))	26374,72±980,09	29467,44±2080,29	0,2085
Lisofosfolípido	Liso-PAF C-16	51138,58±1843,29	48077,47±4179,17	0,4953
Lisofosfatidilcolina	LPC(16:0/0:0)	5282,32±383,82	5563,93±421,26	0,6289
Lisofosfatidilcolina	LPC(17:1(10Z)/0:0)	70,66±8,23	91,20±10,80	0,1528
Lisofosfatidilcolina	LPC(18:0)	381,62±56,55	416,86±36,99	0,6102
Lisofosfatidilcolina	LPC(18:1)	2764,55±450,02	3428,26±339,89	0,2589
Lisofosfatidilcolina	LPC(22:0)	12,06±1,24	13,57±1,32	0,42
Lisofosfatidilcolina	LPC(24:0)	46,90±4,73	84,07±10,85	0,0069
Glicerofosfolina	PC(13:0/13:0)	84,90±6,12	90,78±6,66	0,5262
Fosfatidilcolina	PC(16:0/14:0)	474909,78±22046,57	514329,04±23946,01	0,2459
Fosfatidilcolina	PC(16:1(9Z)/16:1(9Z))	21744,15±2323,11	23168,19±2593,83	0,6888
Fosfatidilcolina	PC(16:0/18:2(9Z,12Z))	48117,94±6169,38	42424,33±3295,60	0,4293
Fosfatidilcolina	PC(17:0/17:0)	6842,47±435,66	9244,96±1037,46	0,0505
Fosfatidilcolina	PC(18:0/14:0)	53759,64±5240,49	57256,15±2737,11	0,5637
Fosfatidilcolina	PC(18:0/18:2(9Z,12Z))	42202,94±2617,81	47183,68±2216,82	0,1686
Fosfatidilcolina	PC(18:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	33120,02±3883,67	38086,31±5150,17	0,4378
Fosfatidilcolina	PC(18:0/22:6)	318327,04±16249,72	300772,17±32643,40	0,6377
Fosfatidilcolina	PC(18:1(9Z)/14:0)	41418,56±2426,34	55398,47±3975,52	0,0095
Fosfatidilcolina	PC(18:1(9Z)/18:0)	12017,37±1075,91	11673,06±1370,54	0,8462
Fosfatidilcolina	PC(19:0/19:0)	37678,88±4983,20	50848,71±4686,86	0,0788
Fosfatidilcolina	PC(20:4/16:0)	440647,68±30430,46	402603,97±16938,99	0,3136
Fosfatidilcolina	PC(38:6)	1078276,21±71437,23	1016347,31±83483,08	0,5819

Fonte: Leite (2022)

Resultados em média ± SEM e valor de P. Valores de P<0,05, são apresentados em vermelho, enquanto valores entre 0,05 e 0,06 são apresentados em laranja. Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

Na análise das células espermáticas do sêmen *in natura*, entre os 26 lipídios detectados, foram observadas diferenças em nove deles (Tabela 43). O grupo com menor suscetibilidade à criopreservação apresentou maior concentração de colesterol e DHA (Tabela 43 e Figuras 99 e 100, respectivamente). No mesmo grupo também houve maior concentração da esfingomielina SM(d18:1/16:0) (Tabela 43 e

Figura 102) e das fosfatidilcolinas PC(16:1(9Z)/16:1(9Z)), PC(17:0/17:0), PC(18:0/18:2(9Z,12Z)) e PC(18:1(9Z)/14:0) (Tabela 43 e Figuras 104 e 105). O grupo com maior suscetibilidade à criopreservação apresentou maior quantidade apenas da esfingosina Sph(d16:0) e da lisofosfatidilcolina LPC(17:1(10Z)/0:0) (Tabela 43 e Figuras 101 e 103, respectivamente).

Tabela 43 - Resultados de lipídios analisados em células espermáticas de sêmen *in natura* dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

Lipídios Concentração (ng/mL)	Sêmen <i>in natura</i>		P
	Maior suscetibilidade à criopreservação (MaS / n=8)	Menor suscetibilidade à criopreservação (MeS / n=8)	
	Média±SEM	Média±SEM	
Colesterol	3231,00±271,29	4166,50±188,15	0,0133
Ácido docosahexaenóico (DHA)	123,21±17,88	217,21±20,81	0,0041
Sph(d16:0)	0,43±0,05	0,29±0,03	0,0203
SM(d18:1/16:0)	2514,57±141,06	3170,40±226,91	0,0278
SM(d18:1/16:1)	9,09±0,55	10,46±0,65	0,129
SM(d18:1/18:0)	1396,33±73,96	1615,60±101,96	0,1036
SM(d18:1/24:0)	1767,38±158,19	2152,48±158,36	0,1074
SM(d18:1/24:1(15Z))	1961,59±210,45	2362,45±266,23	0,2572
Liso-PAF C-16	2176,28±122,99	2230,64±272,50	0,8583
LPC(16:0/0:0)	75,25±5,81	73,07±5,91	0,7969
LPC(17:1(10Z)/0:0)	0,97±0,14	0,60±0,14	0,0445
LPC(18:0)	3,29±0,35	2,82±0,21	0,281
LPC(18:1)	52,16±3,08	54,84±2,90	0,5376
PC(13:0/13:0)	0,32±0,05	0,25±0,03	0,3206
PC(16:0/14:0)	2768,62±240,69	3172,16±164,74	0,1882
PC(16:0/18:2(9Z,12Z))	119,32±11,88	141,67±14,88	0,2602
PC(16:1(9Z)/16:1(9Z))	45,58±3,49	68,42±4,98	0,0021
PC(17:0/17:0)	1267,21±153,27	2092,92±305,17	0,0223
PC(18:0/14:0)	2351,76±267,65	2650,13±173,76	0,3656
PC(18:0/18:2(9Z,12Z))	193,98±12,77	259,26±14,56	0,0046
PC(18:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	233,07±27,09	317,27±30,60	0,0585
PC(18:0/22:6)	2929,94±318,16	2801,94±343,78	0,7886
PC(18:1(9Z)/14:0)	191,30±7,85	251,64±8,53	0,0001
PC(18:1(9Z)/18:0)	184,58±10,02	209,44±12,75	0,1475
PC(20:4/16:0)	1084,41±70,27	1196,28±139,83	0,4864
PC(38:6)	4514,93±542,70	3908,32±390,14	0,4169

Fonte: Leite (2022)

Resultados em média ± SEM e valor de P. Valores de P<0,05, são apresentados em vermelho, enquanto valores entre 0,05 e 0,06 são apresentados em laranja. Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

Nos resultados da análise de células espermáticas do sêmen criopreservado, o perfil de concentração de lipídios é bem diferente do observado nas células de sêmen *in natura*, com diferenças observadas em 22 dos lipídios detectados e uma

concentração maior no grupo com maior suscetibilidade à criopreservação, com exceção apenas de DHA e esfingosina Sph(d16:0) (Tabela 44 e Figuras 100 e 101). Neste grupo foi observada maior concentração de colesterol (Tabela 44 e Figura 99) e das lisofosfatidilcolinas LPC(16:0/0:0), LPC(18:0) e LPC(18:1) (Tabela 44 e Figura 103). Além disso, o grupo *MaS* apresentou ainda maior concentração de todas as esfingomielinas e fosfatidilcolinas detectadas (Tabela 44 e Figuras 102, 104 e 105).

Tabela 44 - Resultados de lipídios analisados em células espermáticas de sêmen criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

Lipídios Concentração (ng/mL)	Sêmen Criopreservado		P
	Maior suscetibilidade à criopreservação ( <i>MaS</i> / n=8)	Menor suscetibilidade à criopreservação ( <i>MeS</i> / n=8)	
	Média±SEM	Média±SEM	
Colesterol	3561,61±193,37	2795,50±182,64	0,0121
Ácido docosahexaenóico (DHA)	184,54±22,47	313,18±38,67	0,0189
Sph(d16:0)	0,07±0,005	0,12±0,02	0,0075
SM(d18:1/16:1)	6,02±0,58	2,70±0,53	0,0008
SM(d18:1/16:0)	827,35±127,87	537,52±59,82	0,0533
SM(d18:1/18:0)	449,43±21,71	260,75±12,64	<,0001
SM(d18:1/24:0)	1402,49±168,19	546,48±55,46	<,0001
SM(d18:1/24:1(15Z))	684,97±59,35	396,59±25,55	0,0005
Liso-PAF C-16	1364,1±187,61	927,59±230,32	0,0652
LPC(16:0/0:0)	190,89±18,12	122,80±16,32	0,0144
LPC(17:1(10Z)/0:0)	0,57±0,12	0,49±0,05	0,7698
LPC(18:0)	12,28±1,93	7,11±1,04	0,0167
LPC(18:1)	310,74±39,99	189,33±13,99	0,0045
PC(13:0/13:0)	0,15±0,02	0,10±0,01	0,045
PC(16:0/14:0)	648,97±63,38	378,13±32,59	0,0019
PC(16:0/18:2(9Z,12Z))	2680,49±392,83	977,77±145,45	0,0001
PC(16:1(9Z)/16:1(9Z))	74,99±7,80	37,83±1,99	<,0001
PC(17:0/17:0)	168,86±16,60	81,34±10,21	0,0002
PC(18:0/14:0)	585,57±99,49	254,61±31,06	0,0009
PC(18:0/18:2(9Z,12Z))	1543,03±227,97	596,02±50,92	<,0001
PC(18:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	2270,24±305,57	766,41±127,51	<,0001
PC(18:0/22:6)	1796,99±226,69	459,99±35,06	<,0001
PC(18:1(9Z)/14:0)	313,80±16,10	144,04±8,50	<,0001
PC(18:1(9Z)/18:0)	876,71±115,07	374,67±75,87	0,0006
PC(20:4/16:0)	1909,38±214,48	637,11±125,91	<,0001
PC(38:6)	1651,34±140,34	534,36±25,76	<,0001

Fonte: Leite (2022)

Resultados em média ± SEM e valor de *P*. Valores de *P*<0,05, são apresentados em vermelho, enquanto valores entre 0,05 e 0,06 são apresentados em laranja. Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

Em relação aos resultados comparando as células espermáticas nos momentos pré e pós-congelação dentro de cada um dos grupos, observou-se uma redução na concentração de colesterol apenas no grupo com menor suscetibilidade à criopreservação (Tabela 46 e Figura 99), grupo que também possuía maior concentração deste lipídio nas células *in natura*. Quanto ao DHA, apesar de um aumento na concentração, não houve diferença nos momentos pré e pós-congelação nos dois grupos (Tabelas 45 e 46 e Figura 100). Nos dois grupos houve redução da concentração da esfingosina Sph(d16:0) após a criopreservação (Tabelas 45 e 46 e Figura 101). Na classe de esfingomielinas, houve redução da concentração de todos os lipídios desta classe no grupo *MeS* e em todos, com a exceção da SM(d18:1/24:0), no grupo *MaS* no momento pós-criopreservação (Tabelas 45 e 46 e Figura 102). Entre os lisofosfolipídios, também houve redução da concentração no momento pós-criopreservação nos dois grupos para o Liso-PAF C-16, importante modulador na cadeia do ácido araquidônico. Quanto aos demais lisofosfolipídios, os dois grupos apresentam maior concentração pós-congelação em todos, com exceção apenas da lisofosfatidilcolina LPC(17:1(10Z)/0:0), para a qual não houve diferença nos tempos (Tabelas 45 e 46 e Figura 103). Nos resultados para as fosfatidilcolinas, o padrão de concentração observado nos tempos foi igual para a maioria dos lipídios desta classe nos dois grupos. Em ambos houve maior concentração nas células pré-congelação nas fosfatidilcolinas PC(13:0/13:0), PC(16:0/14:0), PC(17:0/17:0), PC(18:0/14:0), PC(18:0/22:6) e PC(38:6) e menor concentração nas fosfatidilcolinas PC(16:0/18:2(9Z,12Z)), PC(18:0/18:2(9Z,12Z)), PC(18:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)) e PC(18:1(9Z)/18:0). No entanto, no grupo com menor suscetibilidade à criopreservação, foi observada ainda maior concentração de PC(16:1(9Z)/16:1(9Z)), PC(18:1(9Z)/14:0) e PC(20:4/16:0) nas células pré congelação, enquanto o oposto foi observado no grupo com maior suscetibilidade à criopreservação (Tabelas 45 e 46 e Figuras 104 e 105).



Tabela 45 - Resultados de lipídios analisados em células espermáticas nos momentos pré e pós-criopreservação do grupo com maior suscetibilidade à criopreservação

Lipídios Concentração (ng/mL)	Grupo Maior Suscetibilidade à Criopreservação		P
	Sêmen <i>in natura</i> (n=8)	Sêmen Criopreservado (n=8)	
	Média±SEM	Média±SEM	
Colesterol	3231,00±271,29	3561,61±193,37	0,3379
Ácido docosahexaenóico (DHA)	123,21±17,88	184,54±22,47	0,0509
Sph(d16:0)	0,43±0,05	0,07±0,005	<,0001
SM(d18:1/16:0)	2514,57±141,06	827,35±127,87	<,0001
SM(d18:1/16:1)	9,09±0,55	6,02±0,58	0,0018
SM(d18:1/18:0)	1396,33±73,96	449,43±21,71	<,0001
SM(d18:1/24:0)	1767,38±158,19	1402,49±168,19	0,1363
SM(d18:1/24:1(15Z))	1961,59±210,45	684,97±59,35	<,0001
Liso-PAF C-16	2176,28±122,99	1364,1±187,61	0,0032
LPC(16:0/0:0)	75,24±5,81	190,89±18,12	<,0001
LPC(17:1(10Z)/0:0)	0,97±0,14	0,57±0,12	0,0568
LPC(18:0)	3,29±0,35	12,28±1,93	<,0001
LPC(18:1)	52,16±3,08	310,74±39,99	<,0001
PC(13:0/13:0)	0,32±0,05	0,15±0,02	0,0138
PC(16:0/14:0)	2768,62±240,69	648,97±63,38	<,0001
PC(16:0/18:2(9Z,12Z))	119,32±11,88	2680,49±392,83	<,0001
PC(16:1(9Z)/16:1(9Z))	45,57±3,49	74,99±7,80	0,0023
PC(17:0/17:0)	1267,21±153,27	168,86±16,60	<,0001
PC(18:0/14:0)	2351,76±267,65	585,57±99,49	<,0001
PC(18:0/18:2(9Z,12Z))	193,98±12,77	1543,03±227,97	<,0001
PC(18:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	233,07±27,09	2270,24±305,57	<,0001
PC(18:0/22:6)	2929,94±318,16	1796,99±226,69	0,0116
PC(18:1(9Z)/14:0)	191,30±7,85	313,80±16,10	<,0001
PC(18:1(9Z)/18:0)	184,58±10,02	876,71±115,07	<,0001
PC(20:4/16:0)	1084,40±70,27	1909,38±214,48	0,0005
PC(38:6)	4514,92±542,70	1651,34±140,34	<,0001

Fonte: Leite (2022)

Resultados em média ± SEM e valor de P. Valores de  $P < 0,05$ , são apresentados em vermelho, enquanto valores entre 0,05 e 0,06 são apresentados em laranja. Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

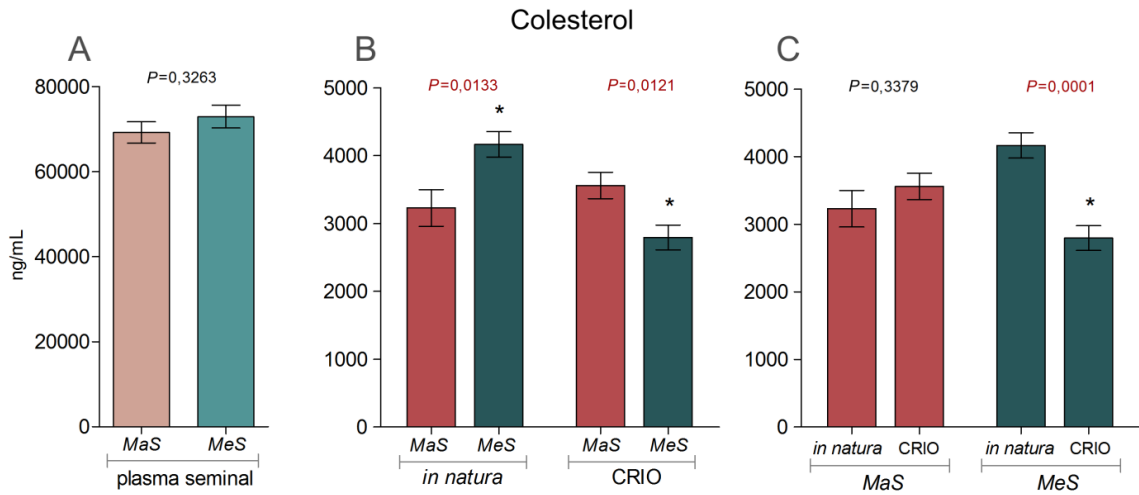
Tabela 46 - Resultados de lipídios analisados em células espermáticas nos momentos pré e pós-criopreservação do grupo com menor suscetibilidade à criopreservação

Lipídios Concentração (ng/mL)	Grupo Menor Suscetibilidade à Criopreservação		P
	Sêmen <i>in natura</i> (n=8)	Sêmen Criopreservado (n=8)	
	Média±SEM	Média±SEM	
Colesterol	4166.50±188.15	2795.50±182.64	0.0001
Ácido docosahexaenóico (DHA)	217.21±20.81	313,18±38,67	0,0705
Sph(d16:0)	0.29±0.03	0.12±0.02	0.0002
SM(d18:1/16:0)	3170.40±226.91	537.52±59.82	<.0001
SM(d18:1/16:1)	10.46±0.65	2.70±0.53	<.0001
SM(d18:1/18:0)	1615.60±101.96	260.75±12.64	<.0001
SM(d18:1/24:0)	2152.48±158.36	546.48±55.46	<.0001
SM(d18:1/24:1(15Z))	2362.45±266.23	396.59±25.55	<.0001
Liso-PAF C-16	2230,64±272,50	927,59±230,32	0,0013
LPC(16:0/0:0)	73.07±5.91	122.80±16.32	0.0094
LPC(17:1(10Z)/0:0)	0.60±0.14	0.49±0.05	0.9587
LPC(18:0)	2.82±0.21	7.11±1.04	<.0001
LPC(18:1)	54.84±2.90	189.33±13.99	<.0001
PC(13:0/13:0)	0.25±0.03	0.10±0.01	0.0001
PC(16:0/14:0)	3172.16±164.74	378.13±32.59	<.0001
PC(16:0/18:2(9Z,12Z))	141.67±14.88	977.77±145.45	<.0001
PC(16:1(9Z)/16:1(9Z))	68.42±4.98	37.83±1.99	<.0001
PC(17:0/17:0)	2092.92±305.17	81.34±10.21	<.0001
PC(18:0/14:0)	2650.13±173.76	226.73±15.82	<.0001
PC(18:0/18:2(9Z,12Z))	259.26±14.56	596.02±50.92	<.0001
PC(18:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	317.27±30.60	766.41±127.51	0.0005
PC(18:0/22:6)	2801.94±343.78	459.99±35.06	<.0001
PC(18:1(9Z)/14:0)	251.64±8.53	144.04±8.50	<.0001
PC(18:1(9Z)/18:0)	209.44±12.75	374.67±75.87	0.0062
PC(20:4/16:0)	1196.28±139.83	637.11±125.91	0.0049
PC(38:6)	3908.32±390.14	534.36±25.76	<.0001

Fonte: Leite (2022)

Resultados em média ± SEM e valor de P. Valores de P<0,05, são apresentados em vermelho. Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

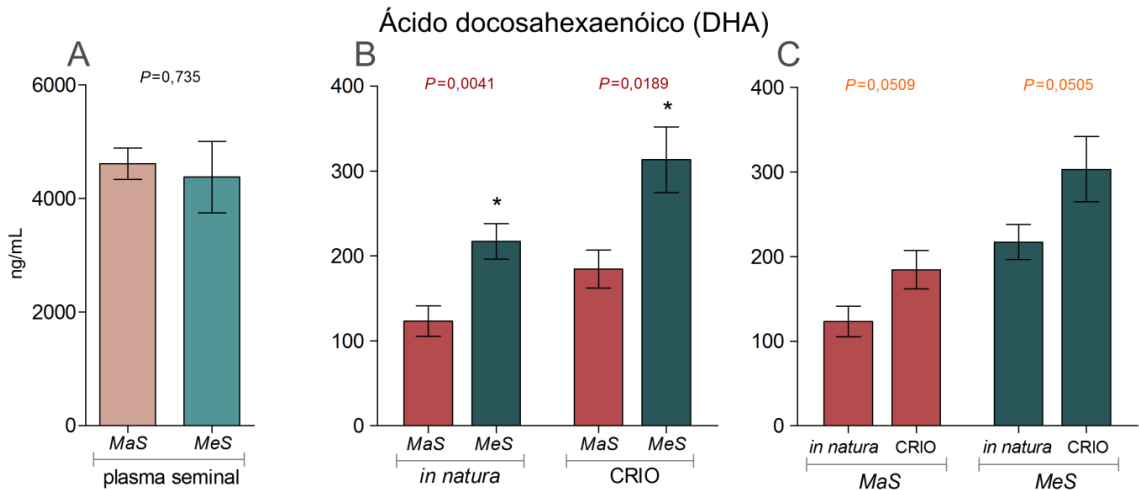
Figura 99 - Gráficos dos resultados das análises de colesterol em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de P são apresentados sobre as barras. MaS: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; MeS: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelação (CRIO).

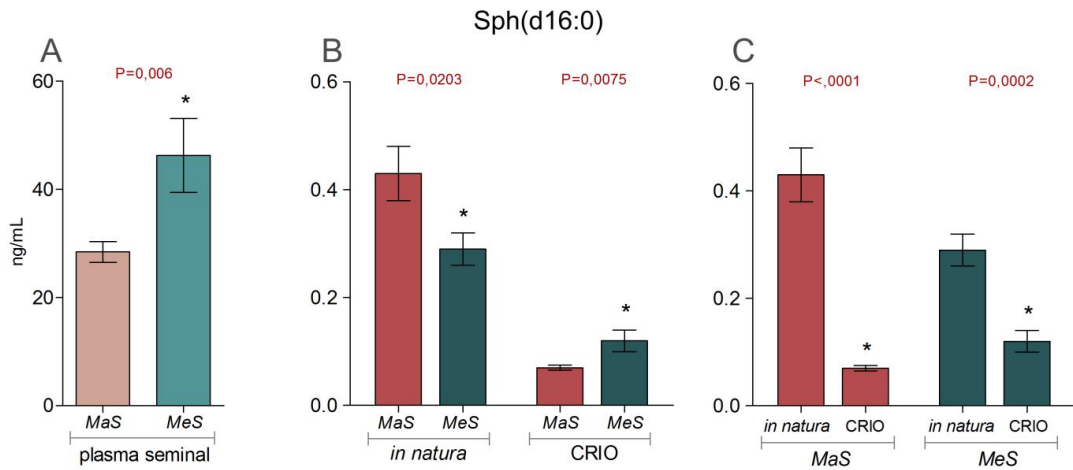
Figura 100 - Gráficos dos resultados das análises de DHA em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de P são apresentados sobre as barras. MaS: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; MeS: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelação (CRIO).

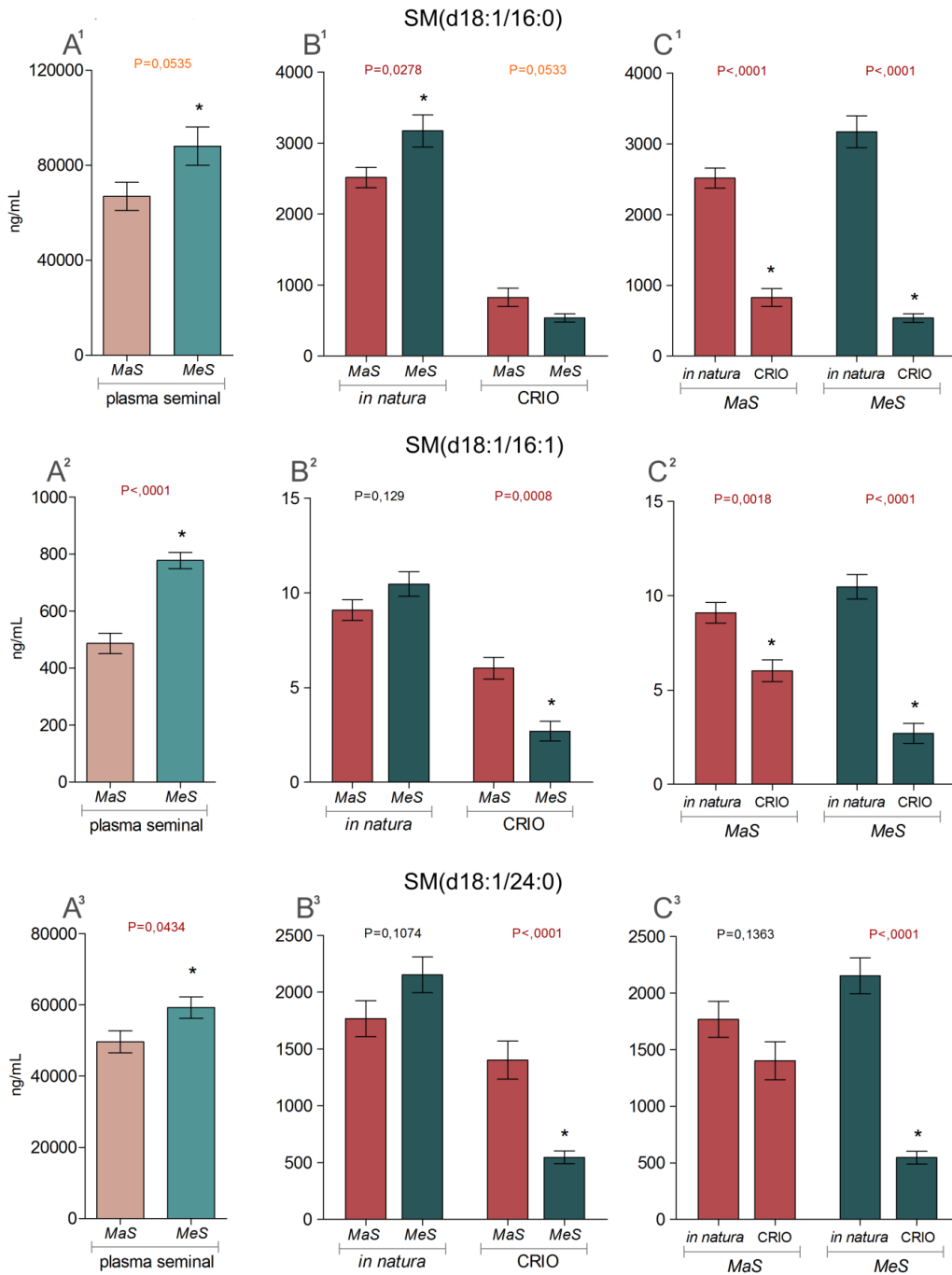
Figura 101 - Gráficos dos resultados das análises da esfingosina Sph(d16:0) em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de *P* são apresentados sobre as barras. *MaS*: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; *MeS*: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelação (CRIO).

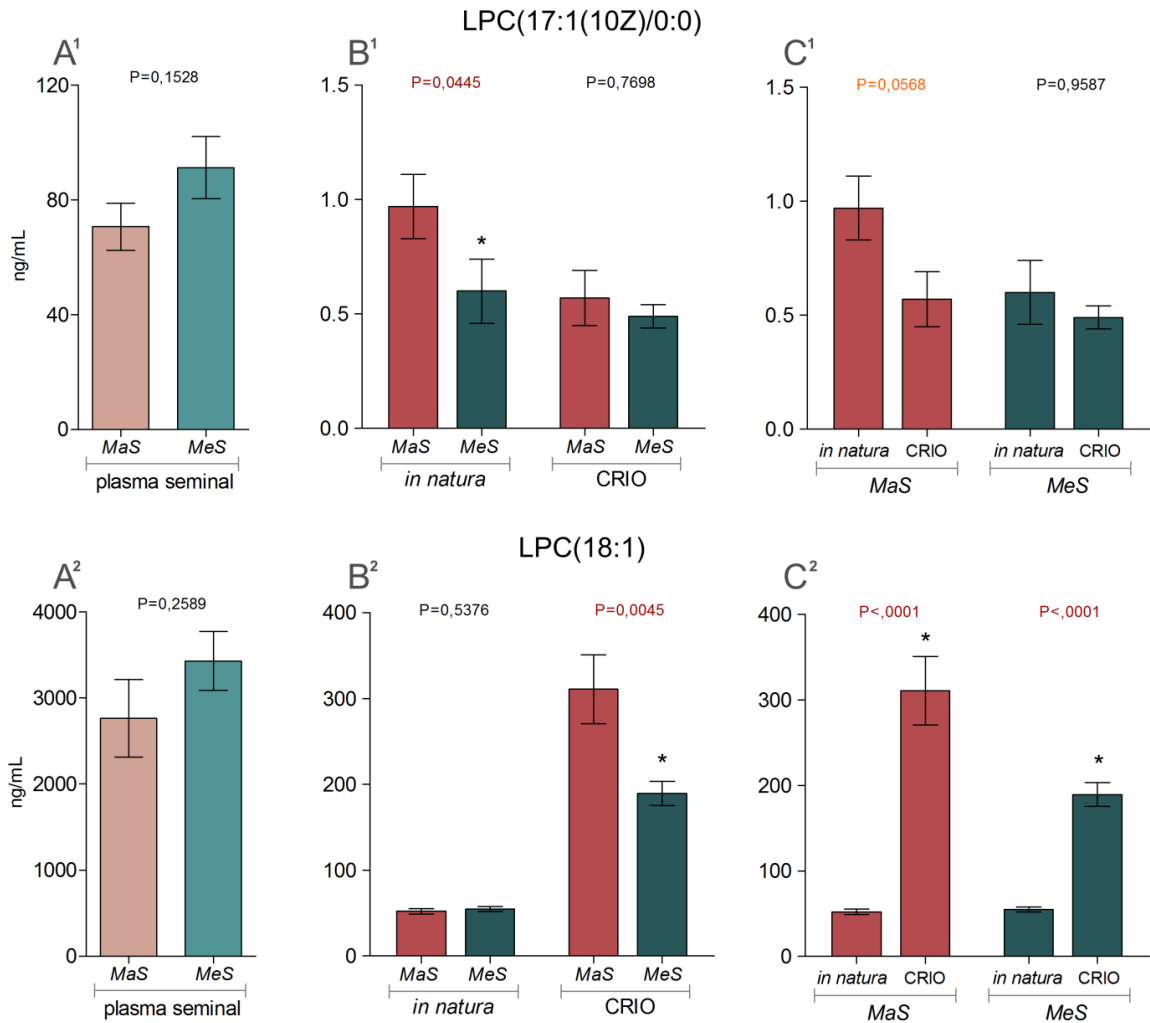
Figura 102 - Gráficos dos resultados das análises de esfingomielinas em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de P são apresentados sobre as barras. MaS: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; MeS: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Os superescritos 1, 2 e 3 acima das letras se referem, respectivamente, às esfingomielinas SM(d18:1/16:0), SM(d18:1/16:1) e SM(d18:1/24:0); Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelação (CRIO).

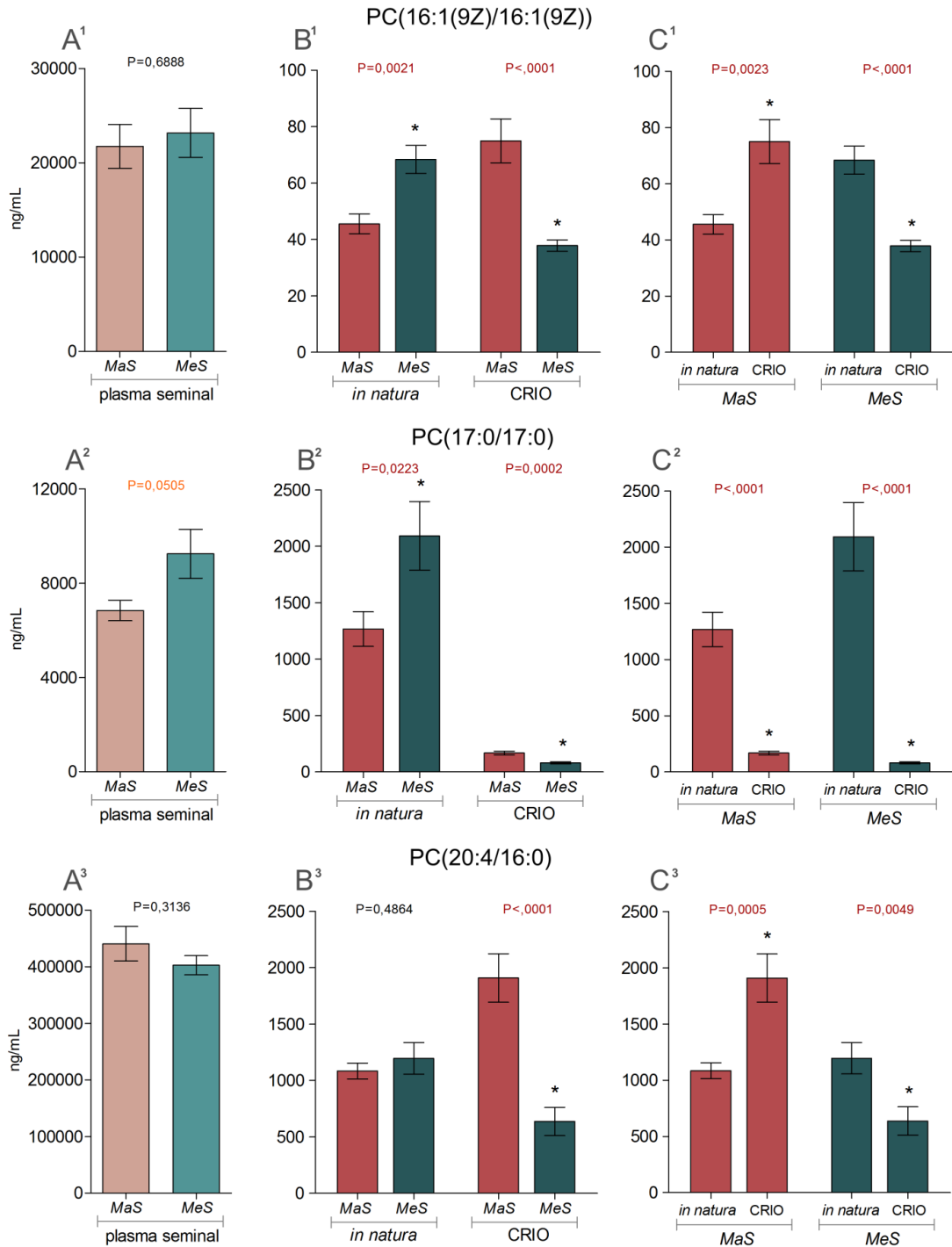
Figura 103 - Gráficos dos resultados das análises de lisofosfatidilcolinas em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de P são apresentados sobre as barras. MaS: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; MeS: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Os superescritos 1 e 2 acima das letras se referem, respectivamente, às lisofosfatidilcolinas LPC(17:1(10Z)/0:0) e LPC(18:1); Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelação (CRIO).

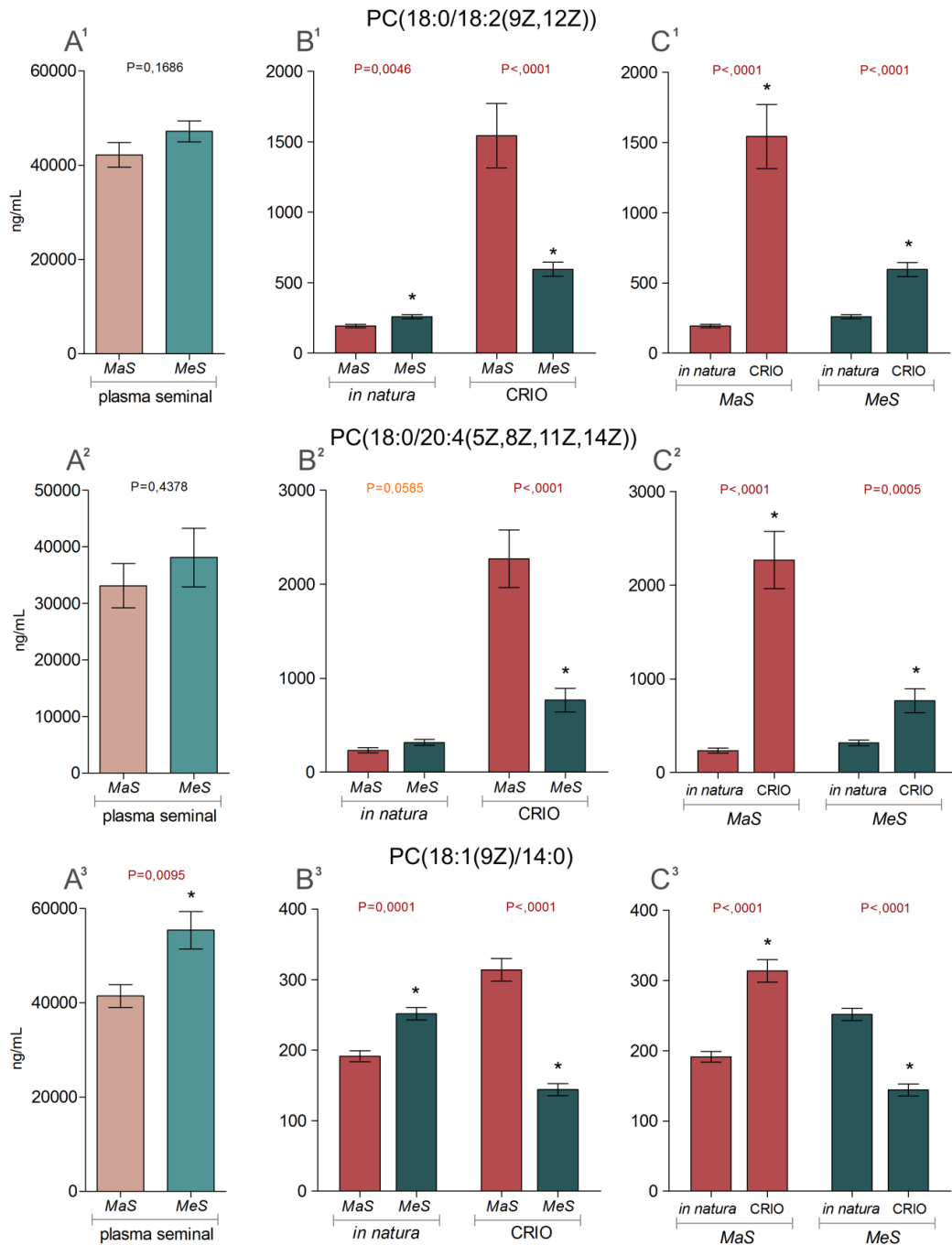
Figura 104 - Gráficos dos resultados das análises de fosfatidilcolinas em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de P são apresentados sobre barras. MaS: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; MeS: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Os superescritos 1, 2 e 3 acima das letras se referem, respectivamente, às fosfatidilcolinas PC(16:1(9Z)/16:1(9Z)), PC(17:0/17:0) e PC(20:4/16:0); Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelação (CRIO).

Figura 105 - Gráficos dos resultados das análises de fosfatidilcolinas em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

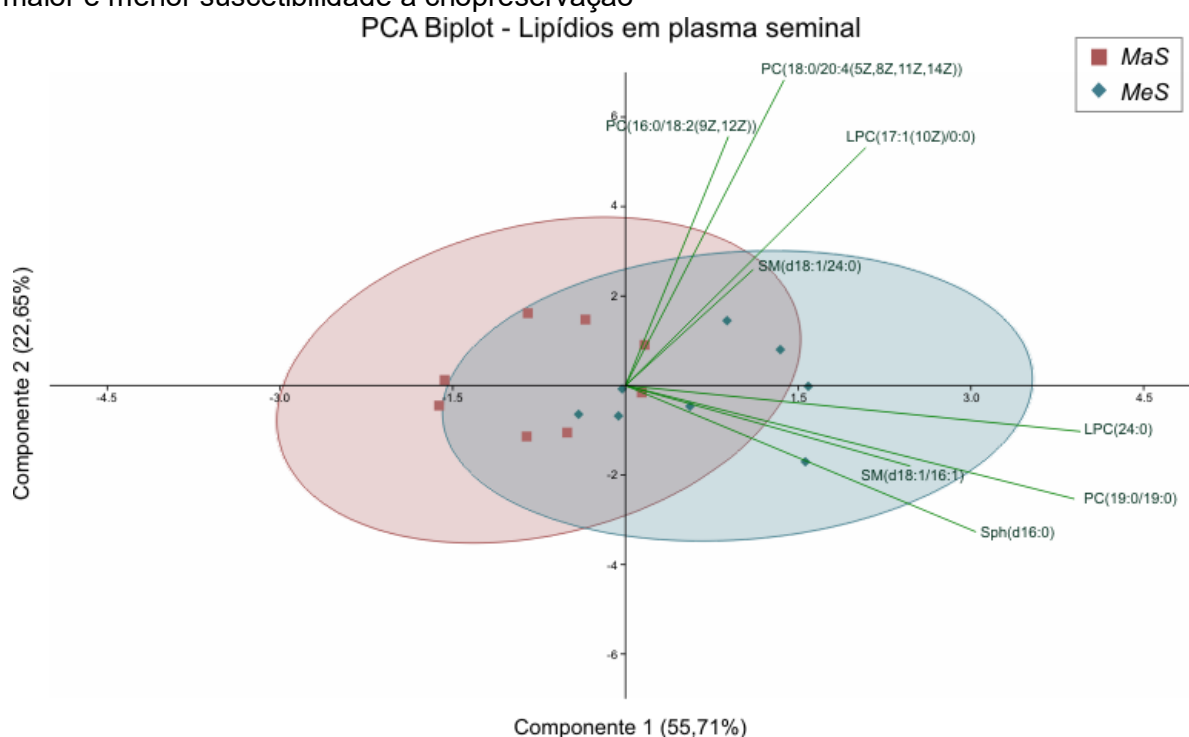
Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de P são apresentados sobre barras. MaS: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; MeS: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Os superescritos 1, 2 e 3 acima das letras se referem, respectivamente, às fosfatidilcolinas PC(18:0/18:2(9Z,12Z)), PC(18:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)) e PC(18:1(9Z)/14:0); Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelação (CRIO).



#### 4.4.2.1.2 Resultados de PCA

A PCA de plasma seminal dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação foi realizada após normalização dos dados e resultou na seleção, pelos valores de *loadings*, de oito lipídios (Apêndice 6) das classes de esfingosinas (Sph(d16:0)), esfingomielinas (SM(d18:1/16:1) e SM(d18:1/24:0)), lisofosfatidilcolinas (LPC(17:1(10Z)/0:0) e LPC(24:0)) e fosfatidilcolinas (PC(16:0/18:2(9Z,12Z)), PC(18:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)) e PC(19:0/19:0)). O componente principal 1 foi responsável por 55,71% da variância e o componente principal 2, por 22,35%, totalizando 78,37%. O PCA *biplot* (Figura 106) mostra que não houve separação entre os grupos, mas indica que os lipídios LPC(24:0), PC(19:0/19:0) e Sph(d16:0) possuem maior peso sobre o grupo com menor suscetibilidade à criopreservação.

Figura 106 - PCA em apresentação *biplot* de lipídios em plasma seminal nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



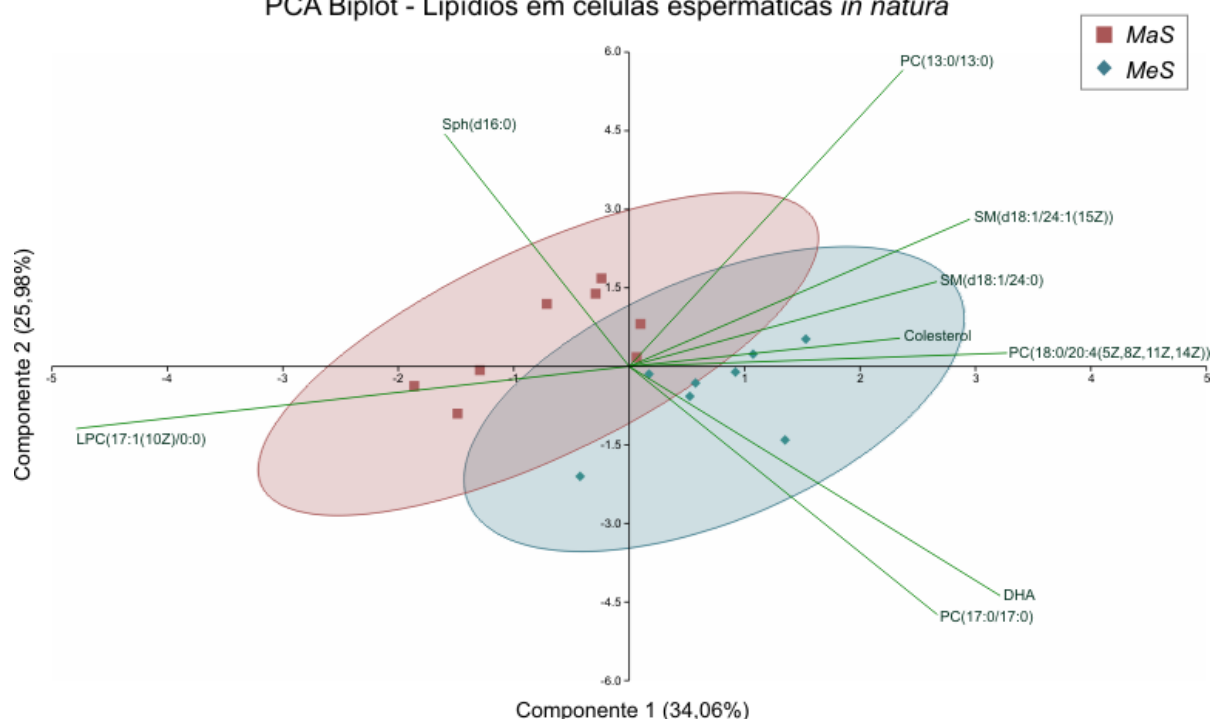
Fonte: Leite (2022)

Representação gráfica da separação entre os grupos com maior (*MaS*) e menor (*MeS*) suscetibilidade à criopreservação com os componentes principais 1 e 2, que respondem por uma variância total de 78,37%. A variância explicada pelos componentes é apresentada entre parênteses. Os *clusters* das amostras dos grupos são indicados conforme a legenda e circundados por elipses de IC. As linhas e texto em verde indicam as variáveis selecionadas e a importância das mesmas (escala *eigenvalue*) na variância e separação dos grupos.

Para as células espermáticas de sêmen *in natura*, os dados foram normalizados e submetidos à PCA, com a seleção de nove variáveis. Os lipídios selecionados com maiores valores de *loadings* (Apêndice 6) foram: Colesterol, DHA,

esfingosina Sph(d16:0), esfingomielinas SM(d18:1/24:0) e SM(d18:1/24:1(15Z)), lisofosfatidilcolina LPC(17:1(10Z)/0:0) e as fosfatidilcolinas PC(13:0/13:0), PC(17:0/17:0) e PC(18:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)). Os componentes principais 1 e 2 foram responsáveis por 34,06% e 25,98% da variância, respectivamente, somando 60,04% da resposta da variância. A análise resultou em pequena separação dos *clusters* das amostras com sobreposição das elipses de IC (Figura 107). O PCA *biplot* indica que os fosfolipídios PC(18:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)) e PC(17:0/17:0), juntamente com o DHA, possuem maior peso sobre o grupo *MeS*, enquanto Sph(d16:0) e LPC(17:1(10Z)/0:0) tem mais influência sobre o grupo *MaS* (Figura 107).

Figura 107 - PCA em apresentação *biplot* de lipídios em células espermáticas de sêmen *in natura* nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação  
PCA Biplot - Lipídios em células espermáticas *in natura*



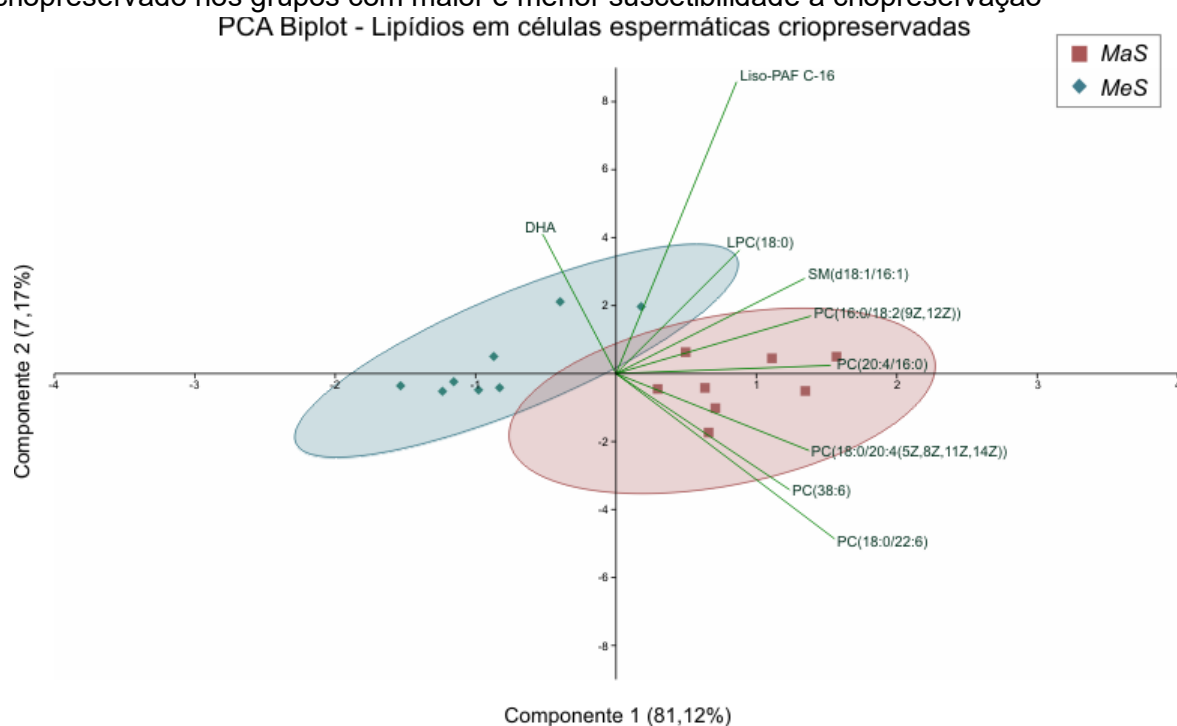
Fonte: Leite (2022)

Representação gráfica da separação entre os grupos com maior (*MaS*) e menor (*MeS*) suscetibilidade à criopreservação com os componentes principais 1 e 2, que respondem por uma variância total de 60,04%. A variância explicada pelos componentes é apresentada entre parênteses. Os *clusters* das amostras dos grupos são indicados conforme a legenda e circundados por elipses de IC. As linhas e texto em verde indicam as variáveis selecionadas e a importância das mesmas (escala *eigenvalue*) na variância e separação dos grupos.

Os dados obtidos de células espermáticas de sêmen criopreservado foram submetidos à PCA, após normalização, com a seleção de nove lipídios. Os maiores valores de *loadings* (Apêndice 6) foram obtidos no DHA, lisofosfolipídios Liso-PAF C-

16 e LPC(18:0), esfingomiélna SM(d18:1/16:1), e fosfatidilcolinas PC(18:0/22:6), PC(20:4/16:0), PC(16:0/18:2(9Z,12Z)), PC(18:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)) e PC(38:6). A resposta da variância dos dois primeiros componentes foi bem maior para esta amostra biológica, com o componente principal 1 sendo responsável por 81,12% da variância e o componente 2 por 7,17%, somando 88,29%. O PCA *biplot* mostra uma clara separação dos *clusters* das amostras e apenas uma pequena sobreposição das elipses de IC (Figura 108). Observou-se maior influência de DHA e Liso-PAF C-16 sobre o grupo *MeS* e das fosfatidilcolinas PC(18:0/22:6) e PC(20:4/16:0) sobre o grupo *MaS* (Figura 108).

Figura 108 - PCA em apresentação *biplot* de lipídios em células espermáticas de sêmen criopreservado nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

Representação gráfica da separação entre os grupos com maior (*MaS*) e menor (*MeS*) suscetibilidade à criopreservação com os componentes principais 1 e 2, que respondem por uma variância total de 88,29%. A variância explicada pelos componentes é apresentada entre parênteses. Os *clusters* das amostras dos grupos são indicados conforme a legenda e circundados por elipses de IC. As linhas e texto em verde indicam as variáveis selecionadas e a importância das mesmas (escala *eigenvalue*) na variância e separação dos grupos.

#### 4.4.2.2 Carnitinas

Com papel importante no metabolismo energético das células espermáticas, as carnitinas foram detectadas em todas as amostras biológicas utilizadas. Os resultados das diferenças entre os grupos e análise multivariada (PCA) são apresentados abaixo em dois tópicos distintos.

##### 4.4.2.2.1 Diferenças entre os grupos

Entre as 11 carnitinas analisadas, todas foram detectadas nas amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado, no entanto a L-Carnitina não foi detectada nas amostras de plasma seminal. Os resultados da análise de plasma seminal entre os grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação mostra que há diferença em oito das carnitinas detectadas e em todas há maior concentração no grupo com menor suscetibilidade à criopreservação (Tabela 47 e Figuras 109 a 116).

Tabela 47 - Resultados de carnitinas analisadas em plasma seminal dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

Carnitinas Concentração (ng/mL)	Plasma Seminal		P
	Maior suscetibilidade à criopreservação (MaS / n=8)	Menor suscetibilidade à criopreservação (MeS / n=8)	
	Média±SEM	Média±SEM	
Propionil-L-carnitina	1386,43±114,64	1706,09±44,90	0,0287
Butiril-L-carnitina	3364,06±173,02	4950,21±198,83	<,0001
Hexanoil-L-carnitina	305,22±22,73	493,08±29,08	0,0002
Octanoil-L-carnitina	34,17±6,80	54,86±7,72	0,0218
O-Decanoil-L-carnitina	4,63±0,76	8,43±1,11	0,0134
Lauroil-L-carnitina	12,59±1,96	22,99±1,23	0,0005
Tetradecanoilcarnitina	27,09±3,30	61,74±4,60	<,0001
Palmitoil-L-carnitina	52,80±5,14	89,37±6,85	0,0008
Estearoil-L-carnitina	47,38±3,95	60,21±5,60	0,0822
Acetilcarnitina	36515,36±1991,57	37895,61±1776,39	0,6131

Fonte: Leite (2022)

Resultados em média ± SEM e valor de P. Valores de P<0,05, são apresentados em vermelho. Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

Na análise das amostras de células espermáticas de sêmen *in natura*, foi observada diferença em sete das 11 carnitinas detectadas (Tabela 48). Houve maior concentração de propionil-L-carnitina (Tabela 48 e Figura 109), lauroil-L-carnitina (Tabela 48 e Figura 114), tetradecanoilcarnitina (Tabela 48 e Figura 115), palmitoil-L-carnitina (Tabela 48 e Figura 116) e L-carnitina (Tabela 48 e Figura 119) no grupo

com menor suscetibilidade à criopreservação, enquanto o grupo com maior suscetibilidade apresentou maior concentração de butiril-L-carnitina (Tabela 48 e Figura 110) e estearoil-L-carnitina (Tabela 48 e Figura 117).

Tabela 48 - Resultados de carnitinas analisadas em células espermáticas de sêmen *in natura* dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

Carnitinas Concentração (ng/mL)	Células Espermáticas de Sêmen <i>in natura</i>		P
	Maior suscetibilidade à criopreservação (MaS / n=8)	Menor suscetibilidade à criopreservação (MeS / n=8)	
	Média±SEM	Média±SEM	
Propionil-L-carnitina	13,67±1,32	18,36±1,25	0,0219
Butiril-L-carnitina	22,42±0,79	17,31±1,64	0,0141
Hexanoil-L-carnitina	0,52±0,02	0,45±0,03	0,1044
Octanoil-L-carnitina	0,12±0,02	0,15±0,02	0,3006
O-Decanoil-L-carnitina	0,03±0,003	0,03±0,005	1,0000
Lauroil-L-carnitina	0,03±0,01	0,06±0,01	0,0043
Tetradecanoilcarnitina	0,15±0,01	0,21±0,01	0,0002
Palmitoil-L-carnitina	0,21±0,004	0,26±0,01	0,0011
Estearoil-L-carnitina	0,17±0,01	0,08±0,01	<,0001
Acetilcarnitina	8662,73±833,25	10307,19±859,12	0,1910
L-carnitina	7585,52±1079,79	15776,12±1192,52	<,0001

Fonte: Leite (2022)

Resultados em média ± SEM e valor de P. Valores de P<0,05, são apresentados em vermelho. Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

Os resultados das amostras de células espermáticas de sêmen criopreservado, mostra uma alteração significativa no padrão de concentração das carnitinas detectadas. Foi observada diferença em todas as carnitinas, com maior concentração de dez delas no grupo com maior suscetibilidade à criopreservação (Tabela 49 e Figuras 109 a 117 e 119). A única exceção foi a acetilcarnitina, que apresentou maior concentração no grupo com menor suscetibilidade à criopreservação (Tabela 49 e Figura 118).

Tabela 49 - Resultados de carnitinas analisadas em células espermáticas de sêmen criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

Carnitinas Concentração (ng/mL)	Células Espermáticas de Sêmen Criopreservado		P
	Maior suscetibilidade à criopreservação (MaS / n=8)	Menor suscetibilidade à criopreservação (MeS / n=8)	
	Média±SEM	Média±SEM	
Propionil-L-carnitina	30,72±3,22	21,57±2,14	0,0235
Butiril-L-carnitina	22,69±1,91	12,69±1,04	0,0004
Hexanoil-L-carnitina	4,07±0,37	2,04±0,16	<,0001

Carnitinas Concentração (ng/mL)	Células Espermáticas de Sêmen Criopreservado		P
	Maior suscetibilidade à criopreservação (MaS / n=8)	Menor suscetibilidade à criopreservação (MeS / n=8)	
	Média±SEM	Média±SEM	
Octanoil-L-carnitina	1,65±0,20	0,84±0,12	0,0010
O-Decanoil-L-carnitina	3,34±0,61	1,39±0,20	0,0003
Lauroil-L-carnitina	5,08±0,81	2,80±0,13	0,0107
Tetradecanoilcarnitina	3,18±0,39	1,68±0,19	0,0029
Palmitoil-L-carnitina	2,42±0,14	1,00±0,16	<,0001
Estearoil-L-carnitina	3,67±0,42	1,10±0,25	<,0001
Acetilcarnitina	2373,30±246,25	3346,38±237,38	0,0130
L-carnitina	1998,92±40,88	1496,68±49,61	0,0002

Fonte: Leite (2022)

Resultados em média ± SEM e valor de P. Valores de P<0,05, são apresentados em vermelho. Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

Em relação aos resultados comparando as células espermáticas nos momentos pré e pós-congelação dentro de cada um dos grupos, a diferença no padrão de concentração de carnitinas nos dois momentos é bem semelhante. Nos dois grupos houve aumento na concentração de hexanoil-L-carnitina, octanoil-L-carnitina, O-decanoil-L-carnitina, lauroil-L-carnitina, tetradecanoilcarnitina, palmitoil-L-carnitina e estearoil-L-carnitina pós-congelação (Tabelas 50 e 51 e Figuras 111 a 117). Ainda nos dois grupos, foi observada redução da concentração de acetilcarnitina e L-carnitina pós-congelação (Tabelas 50 e 51 e Figuras 118 e 119). Exceções foram observadas para propionil-L-carnitina, que teve maior concentração pós-congelação apenas no grupo MaS (Tabela 50 e Figura 109), e butiril-L-carnitina, que apresentou maior concentração no momento pré-congelação apenas no grupo MeS (Tabela 51 e Figura 110).

Tabela 50 - Resultados de carnitinas analisadas em células espermáticas nos momentos pré e pós-criopreservação do grupo com maior suscetibilidade à criopreservação

Carnitinas Concentração (ng/mL)	Grupo Maior Suscetibilidade à Criopreservação		P
	Células Espermáticas de Sêmen <i>in natura</i> (n=8)	Células Espermáticas de Sêmen Criopreservado (n=8)	
	Média±SEM	Média±SEM	
Propionil-L-carnitina	13,67±1,32	30,72±3,22	<,0001
Butiril-L-carnitina	22,42±0,79	22,69±1,91	0,8975
Hexanoil-L-carnitina	0,52±0,02	4,07±0,37	<,0001
Octanoil-L-carnitina	0,12±0,02	1,65±0,20	<,0001
O-Decanoil-L-carnitina	0,03±0,003	3,34±0,61	<,0001
Lauroil-L-carnitina	0,04±0,01	5,08±0,81	<,0001
Tetradecanoilcarnitina	0,15±0,01	3,18±0,39	<,0001

Carnitinas Concentração (ng/mL)	Grupo Maior Suscetibilidade à Criopreservação		P
	Células Espermáticas de Sêmen <i>in natura</i> (n=8)	Células Espermáticas de Sêmen Criopreservado (n=8)	
	Média±SEM	Média±SEM	
Palmitoil-L-carnitina	0,21±0,00	2,42±0,14	<,0001
Estearoil-L-carnitina	0,17±0,01	3,67±0,42	<,0001
Acetilcarnitina	8662,73±833,25	2373,30±246,25	<,0001
L-carnitina	7585,53±1079,79	1998,92±40,88	<,0001

Fonte: Leite (2022)

Resultados em média ± SEM e valor de P. Valores de P<0,05, são apresentados em vermelho. Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

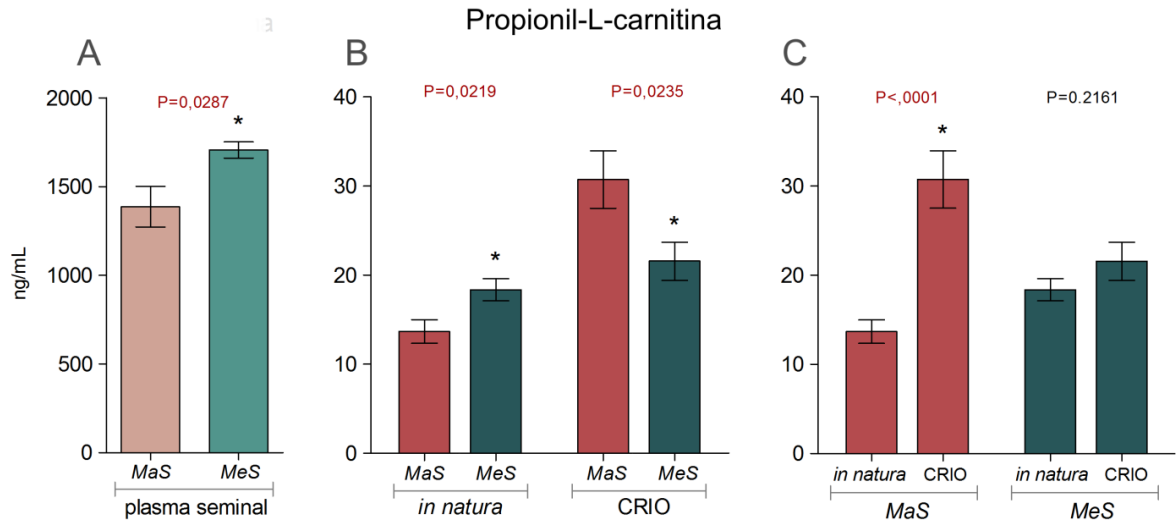
Tabela 51 - Resultados de carnitinas analisadas em células espermáticas nos momentos pré e pós-criopreservação do grupo com menor suscetibilidade à criopreservação

Carnitinas Concentração (ng/mL)	Grupo Menor Suscetibilidade à Criopreservação		P
	Células Espermáticas de Sêmen <i>in natura</i> (n=8)	Células Espermáticas de Sêmen Criopreservado (n=8)	
	Média±SEM	Média±SEM	
Propionil-L-carnitina	18,36±1,25	21,57±2,14	0,2161
Butiril-L-carnitina	17,31±1,64	12,69±1,04	0,0320
Hexanoil-L-carnitina	0,45±0,03	2,04±0,16	<,0001
Octanoil-L-carnitina	0,14±0,02	0,73±0,05	<,0001
O-Decanoil-L-carnitina	0,03±0,004	1,20±0,03	<,0001
Lauroil-L-carnitina	0,06±0,01	2,80±0,13	<,0001
Tetradecanoilcarnitina	0,21±0,01	1,68±0,19	<,0001
Palmitoil-L-carnitina	0,26±0,01	1,00±0,16	<,0001
Estearoil-L-carnitina	0,08±0,01	1,10±0,25	<,0001
Acetilcarnitina	10307,19±859,12	3346,38±237,38	<,0001
L-carnitina	15776,12±1192,52	1496,68±49,61	<,0001

Fonte: Leite (2022)

Resultados em média ± SEM e valor de P. Valores de P<0,05, são apresentados em vermelho. Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

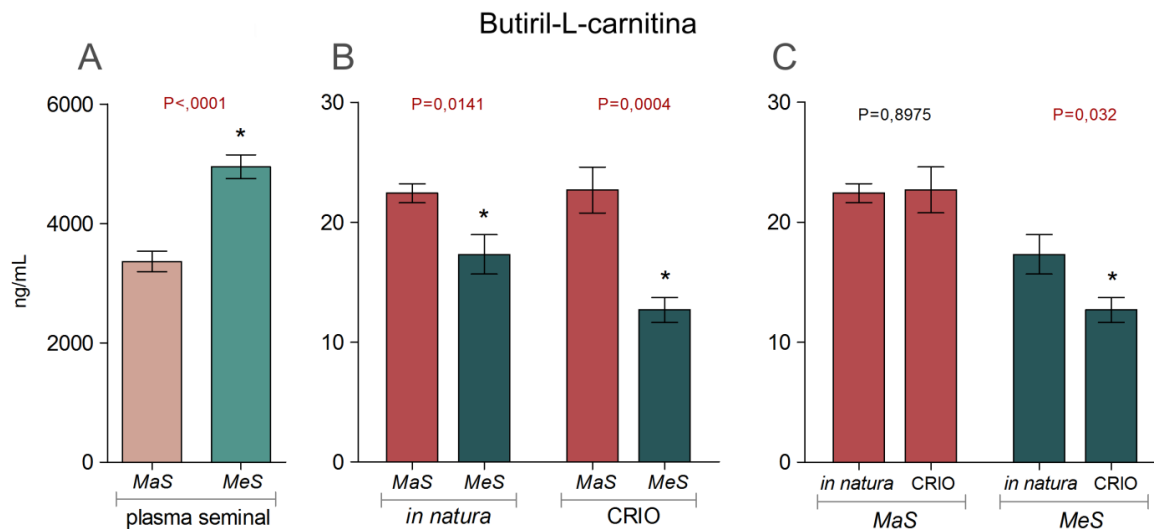
Figura 109 - Gráficos dos resultados das análises de propionil-L-carnitina em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de P são apresentados sobre as barras. MaS: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; MeS: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelação (CRIO).

Figura 110 - Gráficos dos resultados das análises de butiril-L-carnitina em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

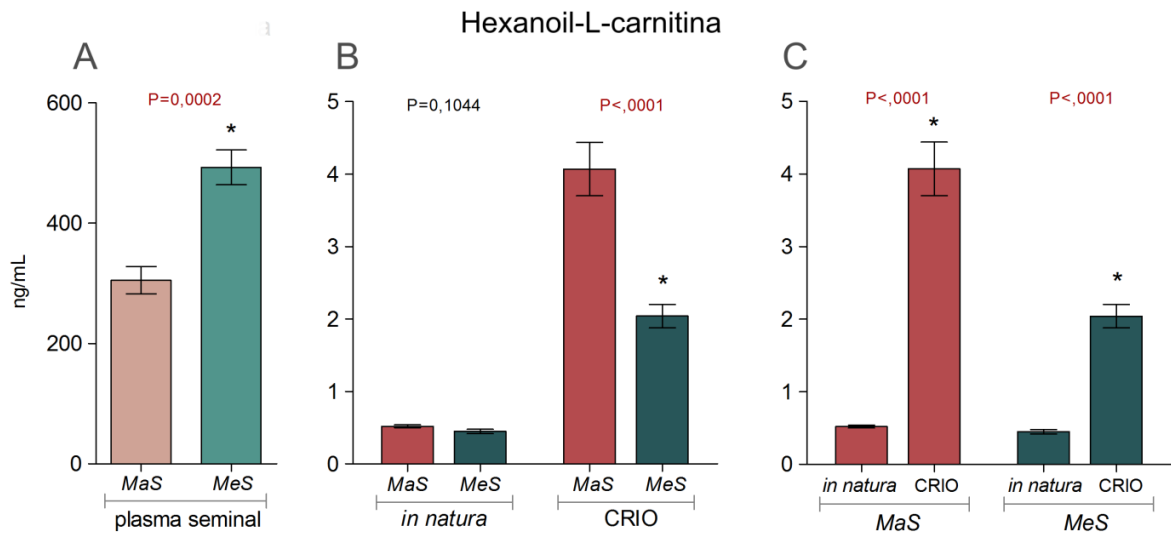


Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de P são apresentados sobre as barras. MaS: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; MeS: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelação (CRIO).



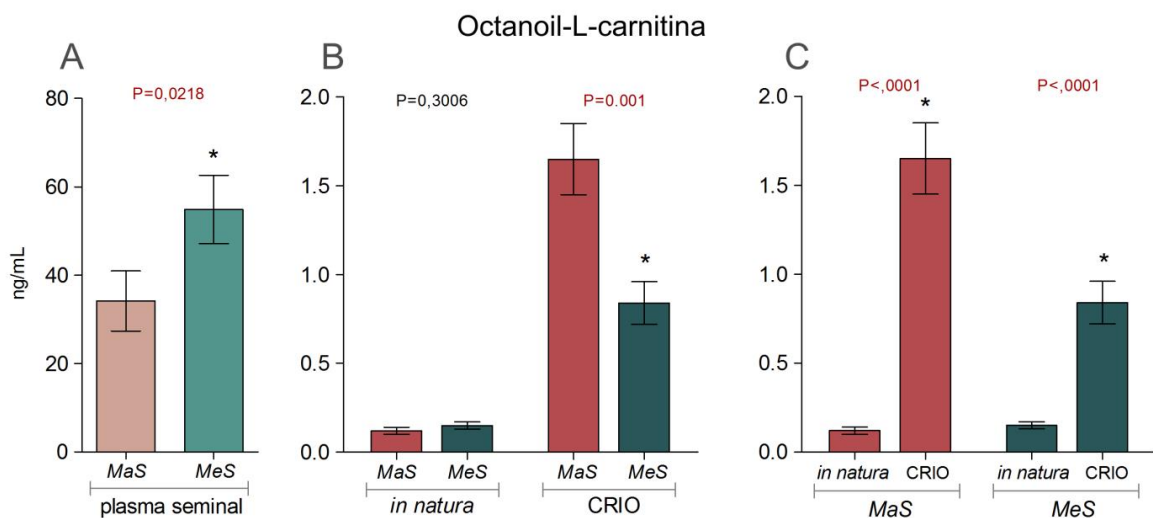
Figura 111 - Gráficos dos resultados das análises de hexanoil-L-carnitina em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de *P* são apresentados sobre as barras. *MaS*: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; *MeS*: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelação (CRIO).

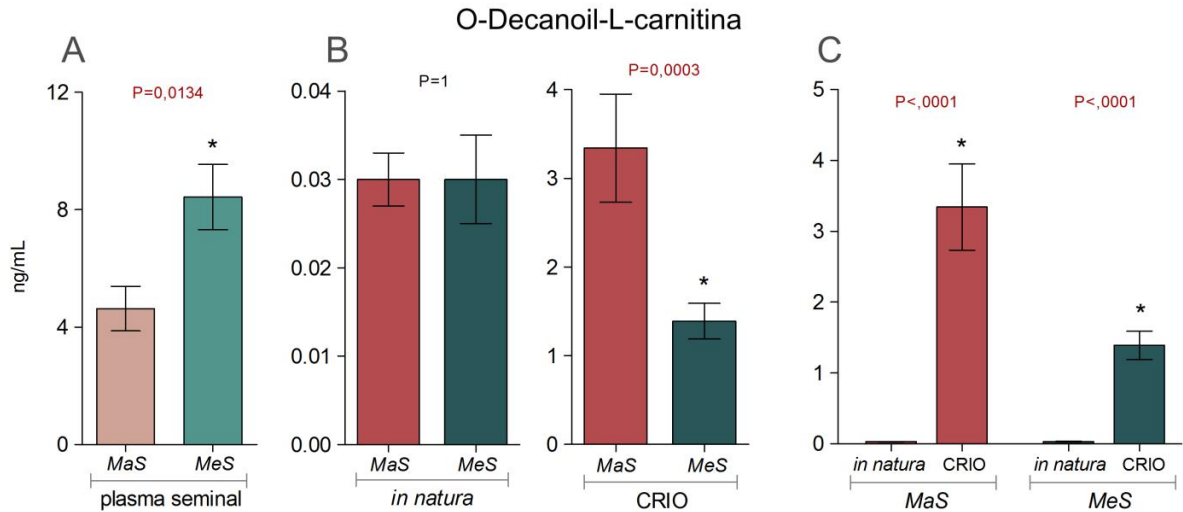
Figura 112 - Gráficos dos resultados das análises de octanoil-L-carnitina em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de *P* são apresentados sobre as barras. *MaS*: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; *MeS*: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelação (CRIO).

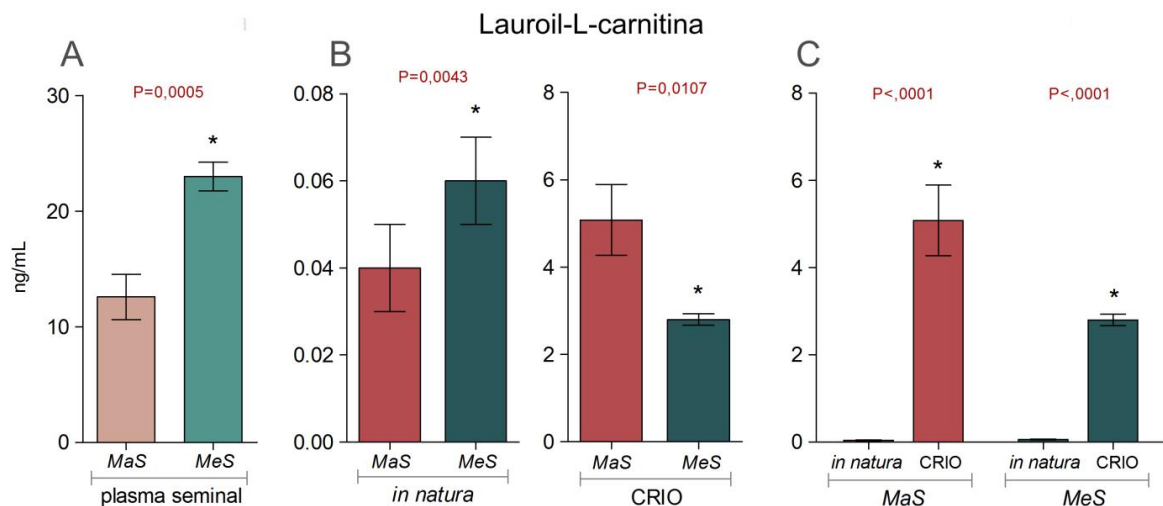
Figura 113 - Gráficos dos resultados das análises de O-decanoil-L-carnitina em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de *P* são apresentados sobre as barras. MaS: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; MeS: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelação (CRIO).

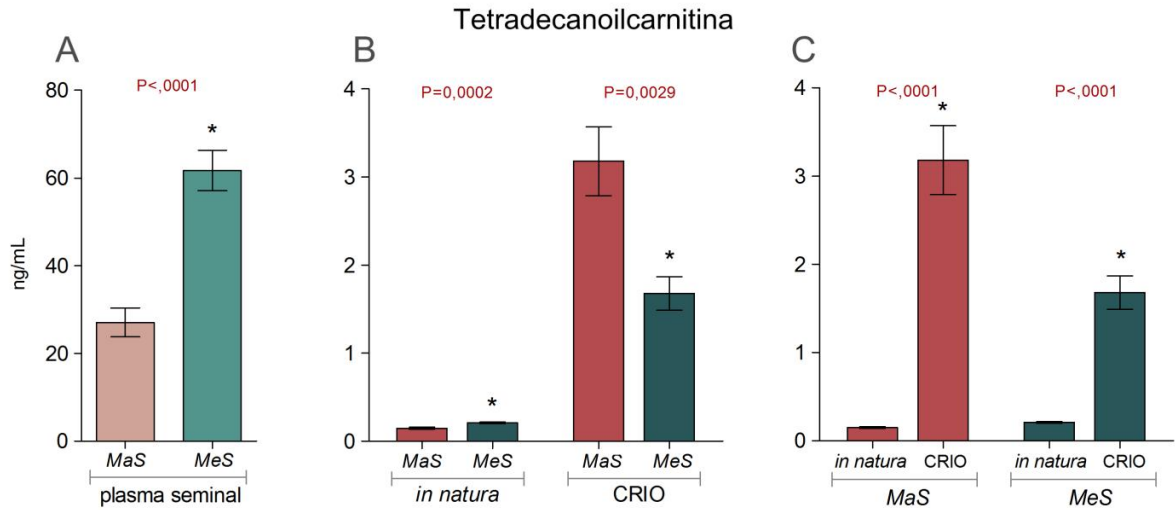
Figura 114 - Gráficos dos resultados das análises de lauroil-L-carnitina em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de *P* são apresentados sobre as barras. MaS: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; MeS: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelação (CRIO).

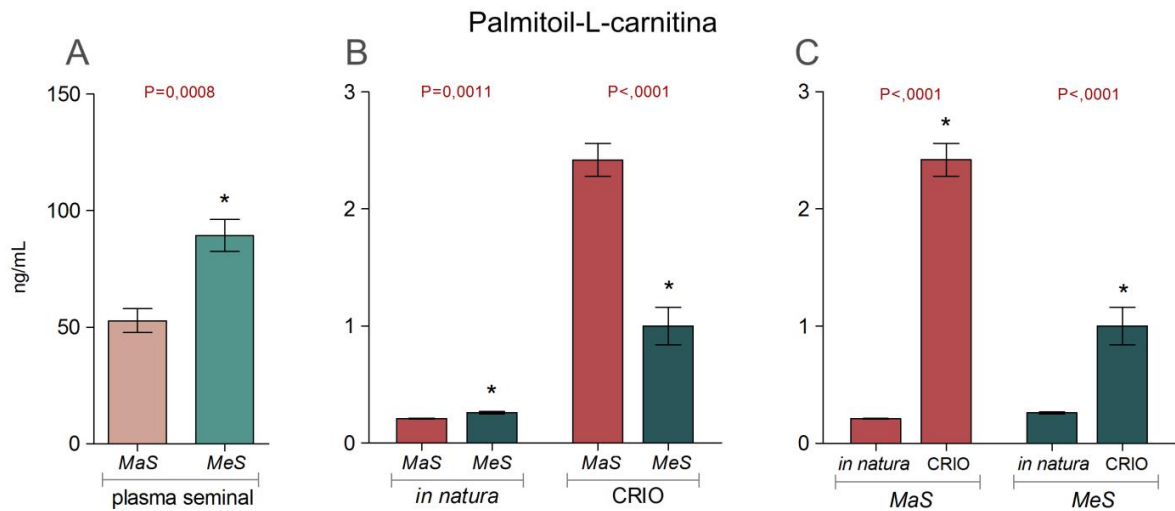
Figura 115 - Gráficos dos resultados das análises de tetradecanoilcarnitina em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de P são apresentados sobre as barras. MaS: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; MeS: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelamento (CRIO).

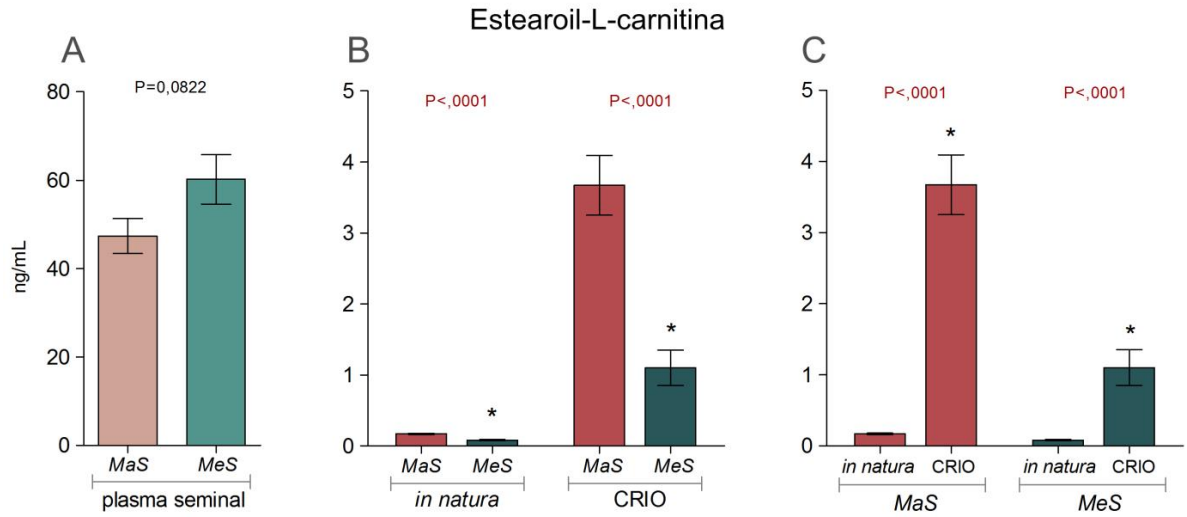
Figura 116 - Gráficos dos resultados das análises de palmitoil-L-carnitina em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de P são apresentados sobre as barras. MaS: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; MeS: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelamento (CRIO).

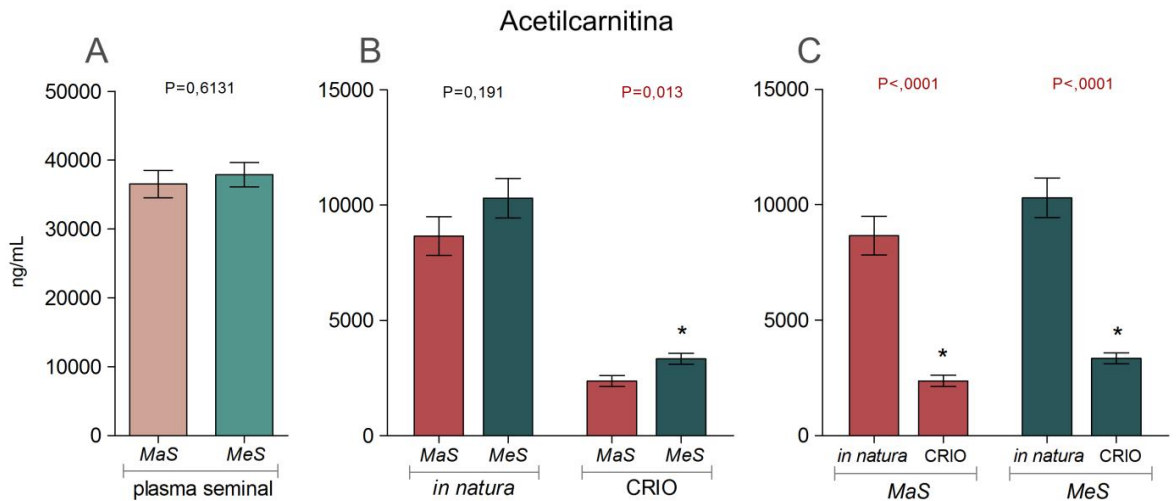
Figura 117 - Gráficos dos resultados das análises de estearoil-L-carnitina em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de P são apresentados sobre as barras. MaS: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; MeS: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelação (CRIO).

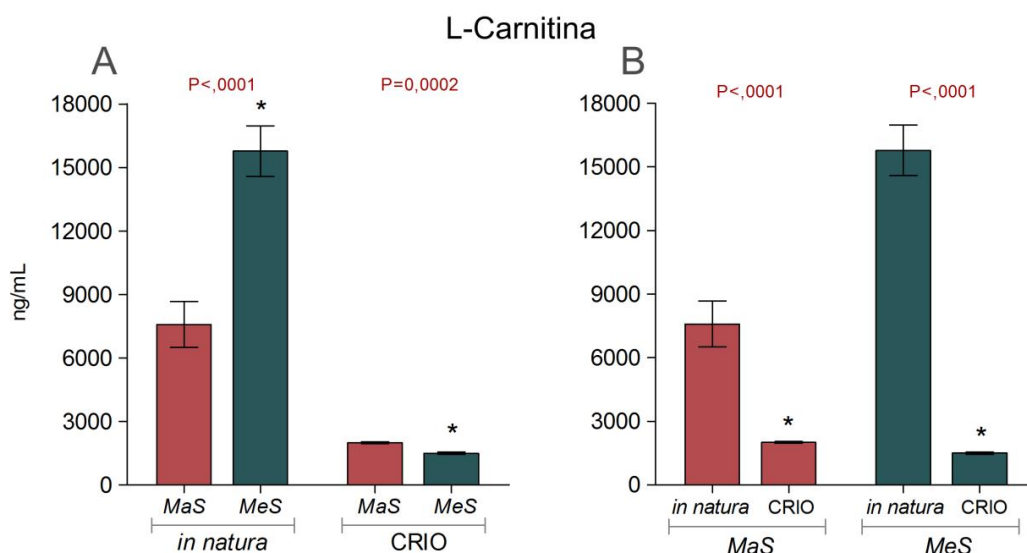
Figura 118 - Gráficos dos resultados das análises de acetilcarnitina em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de P são apresentados sobre as barras. MaS: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; MeS: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelação (CRIO).

Figura 119 - Gráficos dos resultados das análises de L-carnitina em células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



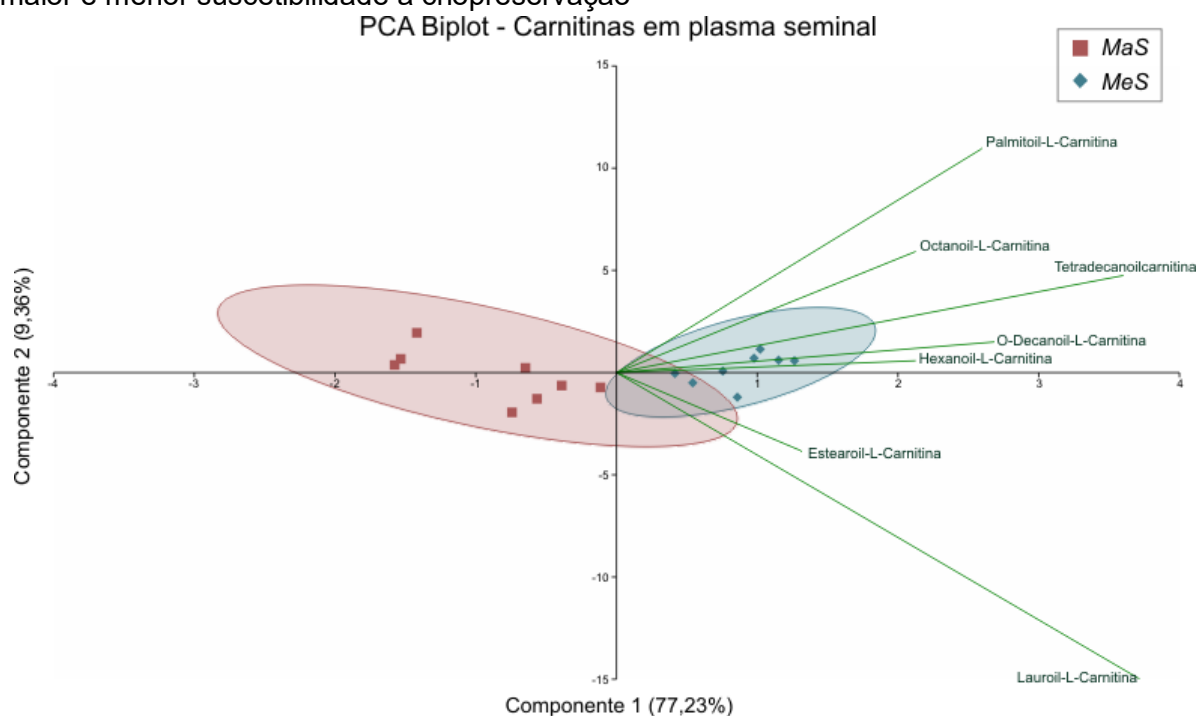
Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de *P* são apresentados sobre as barras. *MaS*: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; *MeS*: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Em A: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em B: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelação (CRIO).

#### 4.4.2.2 Resultados de PCA

A PCA de carnitinas no plasma seminal foi realizada após normalização dos dados e resultou na seleção pelos valores de *loadings* de sete carnitinas (Apêndice 6). As carnitinas selecionadas foram: lauroil-L-carnitina, tetradecanoilcarnitina, O-decanoil-L-carnitina, palmitoil-L-carnitina, hexanoil-L-carnitina, octanoil-L-carnitina e estearoil-L-carnitina. O componente principal 1 foi responsável por 77,24% da variância e o componente principal 2, por 9,36%, totalizando 86,6%. O PCA *biplot* mostra separação entre os *clusters* de amostras e sobreposição das elipses de IC, indicando ainda que todas as carnitinas selecionadas possuem maior influência sobre o grupo com menor suscetibilidade à criopreservação (Figura 120). Entre estas, lauroil-L-carnitina, tetradecanoilcarnitina e palmitoil-L-carnitina são as que possuem maior influência na variância e separação entre os grupos.

Figura 120 - PCA em apresentação *biplot* de carnitinas em plasma seminal nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

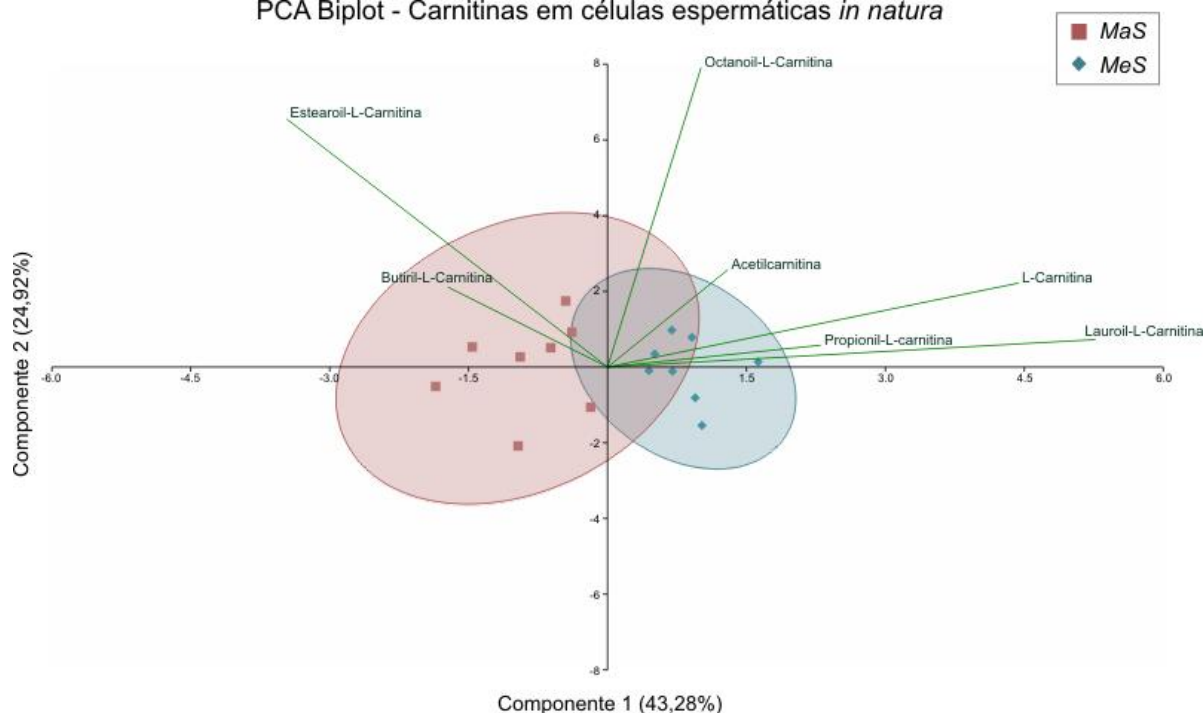


Fonte: Leite (2022)

Representação gráfica da separação entre os grupos com maior (*MaS*) e menor (*MeS*) suscetibilidade à criopreservação com os componentes principais 1 e 2, que respondem por uma variância total de 86,6%. A variância explicada pelos componentes é apresentada entre parênteses. Os *clusters* das amostras dos grupos são indicados conforme a legenda e circundados por elipses de IC. As linhas e texto em verde indicam as variáveis selecionadas e a importância das mesmas (escala *eigenvalue*) na variância e separação dos grupos.

Nas células espermáticas de sêmen *in natura*, após a normalização dos dados houve a seleção de sete carnitinas na PCA. Os maiores valores de *loadings* (Apêndice 6) foram observados em lauroil-L-carnitina, L-carnitina, estearoil-L-carnitina, propionil-L-carnitina, butiril-L-carnitina, acetilcarnitina e octanoil-L-carnitina. Os componentes principais 1 e 2 responderam por 43,28% e 24,92% da variância, respectivamente, com um total de 68,2%. Como observado no plasma seminal, há separação entre os *clusters* de amostras com sobreposição das elipses de IC (Figura 121). Entre as carnitinas selecionadas, lauroil-L-carnitina, L-carnitina e octanoil-L-carnitina possuem maior influência sobre o grupo com menor suscetibilidade à criopreservação, enquanto a estearoil-L-carnitina possui mais efeito sobre o grupo com maior suscetibilidade (Figura 121).

Figura 121 - PCA em apresentação *biplot* de carnitinas em células espermáticas de sêmen *in natura* nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação  
PCA Biplot - Carnitinas em células espermáticas *in natura*

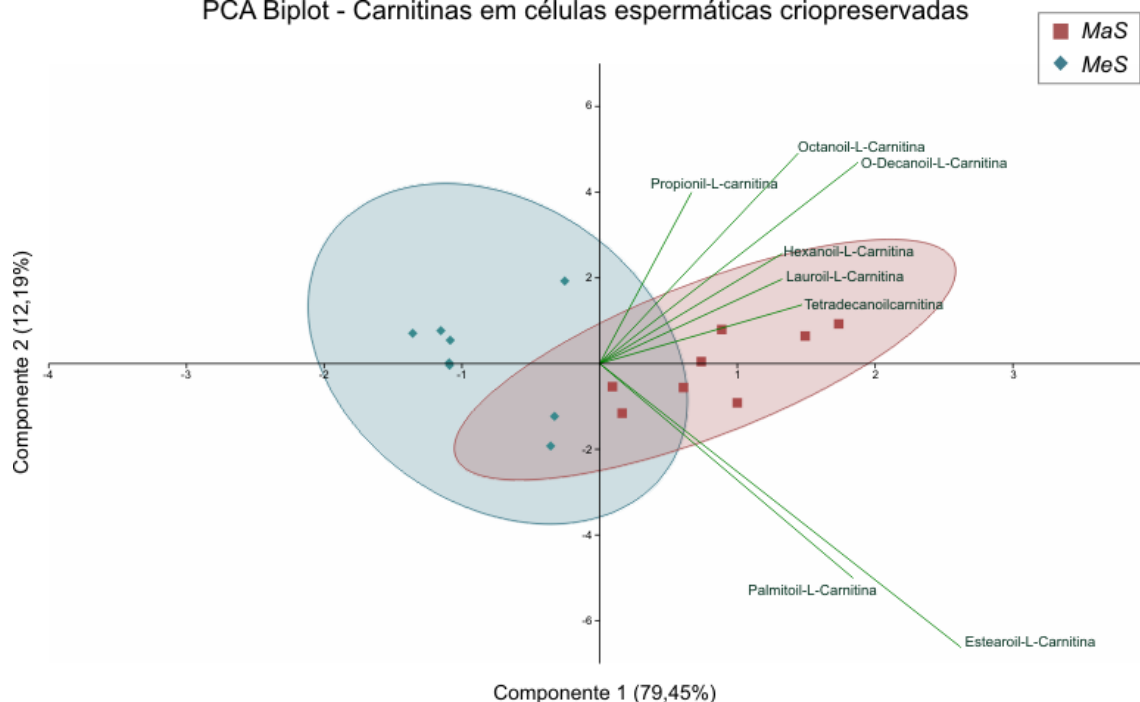


Fonte: Leite (2022)

Representação gráfica da separação entre os grupos com maior (*MaS*) e menor (*MeS*) suscetibilidade à criopreservação com os componentes principais 1 e 2, que respondem por uma variância total de 68,2%. A variância explicada pelos componentes é apresentada entre parênteses. Os *clusters* das amostras dos grupos são indicados conforme a legenda e circundados por elipses de IC. As linhas e texto em verde indicam as variáveis selecionadas e a importância das mesmas (escala *eigenvalue*) na variância e separação dos grupos.

Os dados obtidos de células espermáticas de sêmen criopreservado foram submetidos à PCA após normalização, com a seleção de oito carnitinas. Os maiores valores de *loadings* (Apêndice 6) foram obtidos em estearoil-L-carnitina, O-decanoil-L-carnitina, palmitoil-L-carnitina, tetradecanoilcarnitina, octanoil-L-carnitina, hexanoil-L-carnitina, lauroil-L-carnitina e propionil-L-carnitina. A resposta da variância dos dois primeiros componentes foi de 91,64%, com o componente principal 1 sendo responsável por 79,45% da variância e o componente 2 por 12,19%. A separação dos *clusters* das amostras não é tão clara como observado nas demais amostras biológicas, havendo ainda uma maior sobreposição das elipses de IC (Figura 122). O PCA *biplot* mostra a maior influência de todas as carnitinas selecionadas sobre o grupo com maior suscetibilidade à criopreservação, com destaque para estearoil-L-carnitina e O-decanoil-L-carnitina (Figura 122).

Figura 122 - PCA em apresentação *biplot* de carnitinas em células espermáticas de sêmen criopreservado nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação  
PCA Biplot - Carnitinas em células espermáticas criopreservadas



Fonte: Leite (2022)

Representação gráfica da separação entre os grupos com maior (*MaS*) e menor (*MeS*) suscetibilidade à criopreservação com os componentes principais 1 e 2, que respondem por uma variância total de 91,64%. A variância explicada pelos componentes é apresentada entre parênteses. Os *clusters* das amostras dos grupos são indicados conforme a legenda e circundados por elipses de IC. As linhas e texto em verde indicam as variáveis selecionadas e a importância das mesmas (escala *eigenvalue*) na variância e separação dos grupos.

#### 4.4.2.3 Peptídeos, aminoácidos e derivados

Os metabólitos desta classe são imprescindíveis para a sobrevivência celular, atuando, por exemplo, em ciclos de produção de energia, metabolismo de lipídios e carboidratos, processos antioxidantes, entre outros. Nesta categoria, metabólitos detectados com PID foram normalizados pela área e concentração do mesmo, e seus dados convertidos em concentração em ng/mL. Para os metabólitos detectados sem PID, a normalização foi feita pela área do pico de sulfona de metionina (derivado de aminoácido) de cada amostra, e seus dados apresentados em *area ratio*. Os resultados abrangem as diferenças entre os grupos estudados nas diferentes amostras biológicas e PCA, apresentados abaixo em dois tópicos distintos. Vale salientar que as figuras contêm apenas gráficos de metabólitos selecionados, no entanto, todos os resultados são apresentados nas tabelas.



#### 4.4.2.3.1 Diferenças entre os grupos

Entre os resultados de peptídeos, aminoácidos e derivados analisados, 28 metabólitos foram detectados em células espermáticas e 29 no plasma seminal, com a diferença sendo a detecção de asparagina. No plasma seminal, houve diferença entre os grupos em 16 metabólitos. No grupo com menor suscetibilidade à criopreservação foi observada maior concentração da maior parte dos aminoácidos detectados: ácidos aspártico e glutâmico, cistina, fenilalanina, glicina, isoleucina, lisina, metionina, prolina, serina, tirosina e triptofano (Tabela 52 e Figuras 124 a 129). Em contrapartida, no grupo com maior suscetibilidade à criopreservação houve maior concentração apenas de citrulina, hidroxiprolina e dos derivados dimetilglicina e quinurenina (Tabela 52 e Figuras 129 a 131).

Tabela 52 - Resultados de peptídeos, aminoácidos e derivados analisados em plasma seminal dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

Classe	Peptídeos, aminoácidos e derivados com PID (concentração em ng/mL)	Plasma Seminal		P
		Maior suscetibilidade à criopreservação (MaS / n=8)	Menor Suscetibilidade à criopreservação (MeS / n=8)	
		Média±SEM	Média±SEM	
tripeptídeo	Glutationa	6117,57±395,41	6331,15±236,65	0,6501
aa não essencial	Ácido aspártico	2996,74±280,79	5415,77±454,09	0,0002
aa não essencial	Ácido glutâmico	2308,50±201,64	3420,97±240,86	0,0033
aa não essencial	Alanina	846,45±69,65	701,37±41,37	0,095
aa essencial	Arginina	38170,64±1835,91	39098,49±2361,24	0,761
aa não essencial	Cistina	445,47±25,97	539,15±26,06	0,0233
aa essencial	Fenilalanina	10976,75±311,13	12439,07±293,68	0,0042
aa não essencial	Glicina	3914,34±429,47	5596,67±350,42	0,0089
aa essencial	Histidina	2598,93±154,64	2937,46±182,32	0,1786
aa essencial	Isoleucina	11750,35±443,85	14363,21±438,62	0,0009
aa essencial	Leucina	26988,61±1326,80	30092,75±611,31	0,0519
aa essencial	Lisina	1026,41±77,84	1425,45±116,11	0,0127
aa essencial	Metionina	9529,29±567,27	12278,56±609,20	0,0052
aa não essencial	Ornitina	462,44±18,03	439,80±23,36	0,4556
aa não essencial	Prolina	4533,87±428,10	6086,18±202,37	0,0055
aa não essencial	Serina	10260,27±396,18	16996,37±660,50	<,0001
aa essencial	Tirosina	9634,27±567,82	11256,06±432,78	0,0394
aa essencial	Treonina	447,99±39,89	522,64±63,10	0,3424
aa essencial	Triptofano	10537,20±201,44	12068,20±454,52	0,0068
aa essencial	Valina	16420,32±1060,41	19117,49±1006,08	0,0863
derivado (metionina) e PID	Sulfona de metionina	2,81±0,25	2,98±0,21	0,6151

Classe	Peptídeos, aminoácidos e derivados sem PID ( <i>area ratio</i> )	Maior suscetibilidade à criopreservação ( <i>MaS</i> / <i>n=8</i> )	Menor Suscetibilidade à criopreservação ( <i>MeS</i> / <i>n=8</i> )	<i>P</i>
		Média±SEM	Média±SEM	
dímero de glutationa	Glutaciona oxidada	0,05±0,01	0,06±0,01	0,1774
aa não essencial	Asparagina	3,72±0,16	3,38±0,12	0,1094
aa não essencial	Citrulina	32,91±1,44	22,20±1,15	<,0001
aa não essencial	Glutamina	58,21±3,47	49,40±3,74	0,106
aa não essencial	Hidroxiprolina	5,28±0,13	3,89±0,32	0,0029
derivado (glicina e arginina)	Creatina	630,33±23,89	610,48±36,74	0,6575
derivado (glicina)	Dimetilglicina	91,66±4,92	58,45±2,83	<,0001
derivado (triptofano)	Quinurenina	32,67±1,22	25,41±1,35	0,0013

Fonte: Leite (2022)

Metabólitos detectados com PID foram normalizados pelos mesmos e seus dados convertidos em concentração em ng/mL. Metabólitos detectados sem PID foram normalizados com a sulfona de metionina e seus dados estão em *area ratio*. Resultados em média ± SEM e valor de *P*. Valores de *P*<0,05, são apresentados em vermelho, valores entre 0,05 e 0,06 são apresentados em laranja. Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

Nas células espermáticas de sêmen *in natura*, o padrão observado acima, com maior concentração de metabólitos no grupo com menor suscetibilidade à criopreservação se torna ainda mais evidente, com maior concentração do tripeptídeo glutaciona (Tabela 53 e Figura 123) e de todos os aminoácidos e derivados que apresentaram diferença (Tabela 53 e Figuras 124 a 130). Os únicos metabólitos em que não houve diferença entre os grupos foram cistina, glutaciona oxidada (com alta tendência) e dimetilglicina.

Tabela 53 - Resultados de peptídeos, aminoácidos e derivados analisados em células espermáticas de sêmen *in natura* dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

Peptídeos, aminoácidos e derivados com PID (concentração em ng/mL)	Sêmen <i>in natura</i>		<i>P</i>
	Maior suscetibilidade à criopreservação ( <i>MaS</i> / <i>n=8</i> )	Menor suscetibilidade à criopreservação ( <i>MeS</i> / <i>n=8</i> )	
	Média±SEM	Média±SEM	
Glutaciona	496,45±30,44	1160,53±73,13	<,0001
Ácido aspártico	18,05±0,84	44,19±2,94	<,0001
Ácido glutâmico	3522,34±420,39	6211,56±464,44	0,0007
Alanina	381,33±43,22	713,49±76,99	0,0009
Arginina	1413,75±116,35	3330,40±142,84	<,0001
Cistina	10,62±0,68	11,62±0,71	0,3254
Fenilalanina	241,96±23,49	588,58±44,15	<,0001
Glicina	33,74±2,10	64,37±2,60	<,0001
Histidina	209,60±23,03	461,16±32,87	<,0001
Isoleucina	258,25±21,31	666,61±37,22	<,0001
Leucina	1053,96±43,41	2737,14±245,76	<,0001

Peptídeos, aminoácidos e derivados com PID (concentração em ng/mL)	Sêmen <i>in natura</i>		P
	Maior suscetibilidade à criopreservação (MaS / n=8)	Menor suscetibilidade à criopreservação (MeS / n=8)	
	Média±SEM	Média±SEM	
Lisina	106,89±5,23	190,34±13,76	<,0001
Metionina	216,55±26,00	493,12±27,83	<,0001
Ornitina	14,38±0,93	21,47±0,86	<,0001
Prolina	264,17±17,68	544,96±44,40	<,0001
Serina	55,08±2,74	107,14±3,94	<,0001
Tirosina	225,95±27,01	510,07±27,59	<,0001
Treonina	7,32±0,79	12,51±0,75	0,0003
Triptofano	185,86±4,30	474,70±22,80	<,0001
Valina	625,85±25,99	1059,02±79,15	<,0001
Sulfona de metionina	0,51±0,02	0,60±0,03	0,0188
Peptídeos, aminoácidos e derivados sem PID ( <i>area ratio</i> )	Maior suscetibilidade à criopreservação (MaS / n=8)	Menor suscetibilidade à criopreservação (MeS / n=8)	P
	Média±SEM	Média±SEM	
	Glutationa oxidada	0,08±0,01	
Citrulina	3,33±0,08	5,19±0,36	<,0001
Glutamina	3,86±0,19	7,50±0,31	<,0001
Hidroxiprolina	0,12±0,01	0,31±0,01	<,0001
Creatina	9,34±0,72	17,30±0,90	<,0001
Dimetilglicina	112,29±4,83	100,91±4,99	0,1234
Quinurenina	0,55±0,06	1,24±0,06	<,0001

Fonte: Leite (2022)

Metabólitos detectados com PID foram normalizados pelos mesmos e seus dados convertidos em concentração em ng/mL. Metabólitos detectados sem PIS foram normalizados com a sulfona de metionina e seus dados estão em *area ratio*. Resultados em média ± SEM e valor de P. Valores de  $P < 0,05$ , são apresentados em vermelho e valores entre 0,05 e 0,06 são apresentados em laranja. Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

Os resultados das análises em células espermáticas de sêmen criopreservado mostram uma alteração no padrão observado nas demais amostras biológicas. No grupo com menor suscetibilidade à criopreservação foi detectada maior concentração de glutatona (Tabela 54 e Figura 123) e dos aminoácidos ácido glutâmico, metionina, prolina, treonina, valina, glutamina e hidroxiprolina (Tabela 54 e Figuras 124, 127, 128 e 130). No grupo com maior suscetibilidade à criopreservação, houve maior concentração dos aminoácidos arginina, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, tirosina, triptofano e citrulina (Tabela 54 e Figuras 125, 126, 128 e 129) e de dimetilglicina (Tabela 54 e Figura 131).

Tabela 54 - Resultados de peptídeos, aminoácidos e derivados analisados em células espermáticas de sêmen criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

Peptídeos, aminoácidos e derivados com PID (concentração em ng/mL)	Sêmen Criopreservado		P
	Maior suscetibilidade à criopreservação (MaS / n=8)	Menor suscetibilidade à criopreservação (MeS / n=8)	
	Média±SEM	Média±SEM	
Glutationa	127,18±7,79	154,11±6,29	0,0176
Ácido aspártico	5,16±0,29	4,44±0,22	0,0716
Ácido glutâmico	135,25±10,86	204,53±18,71	0,0036
Alanina	71,20±7,07	60,01±3,94	0,1889
Arginina	383,75±25,25	254,72±7,49	0,0001
Cistina	3,00±0,15	3,31±0,14	0,1575
Fenilalanina	212,95±6,12	153,48±4,74	<,0001
Glicina	8,10±0,60	5,63±0,42	0,0046
Histidina	39,28±3,16	28,23±2,03	0,0107
Isoleucina	199,14±15,70	135,32±4,39	0,0002
Leucina	386,21±32,07	246,58±17,87	0,0013
Lisina	40,18±1,67	26,67±2,01	0,0001
Metionina	22,42±2,16	43,25±3,50	<,0001
Ornitina	2,25±0,23	2,76±0,28	0,1848
Prolina	109,15±4,98	168,72±21,87	0,0082
Serina	9,75±0,62	8,89±0,47	0,2862
Tirosina	210,30±22,18	136,24±11,36	0,0081
Treonina	4,23±0,39	5,36±0,27	0,0308
Triptofano	66,30±2,36	48,70±1,46	<,0001
Valina	176,85±14,42	248,95±22,75	0,0181
Sulfona de metionina	0,49±0,01	0,51±0,01	0,3032
Peptídeos, aminoácidos e derivados sem PID (area ratio)	Maior suscetibilidade à criopreservação (MaS / n=8)	Menor suscetibilidade à criopreservação (MeS / n=8)	P
	Média±SEM	Média±SEM	
	Média±SEM	Média±SEM	
Glutationa oxidada	0,65±0,06	0,66±0,08	0,9755
Citrulina	0,76±0,04	0,41±0,02	<,0001
Glutamina	0,65±0,05	1,02±0,08	0,0009
Hidroxiprolina	0,12±0,01	0,19±0,01	<,0001
Creatina	0,94±0,05	1,03±0,05	0,2415
Dimetilglicina	20,81±0,69	12,88±0,65	<,0001
Quinurenina	0,02±0,002	0,02±0,002	0,7394

Fonte: Leite (2022)

Metabólitos detectados com PID foram normalizados pelos mesmos e seus dados convertidos em concentração em ng/mL. Metabólitos detectados sem PID foram normalizados com a sulfona de metionina e seus dados estão em *area ratio*. Resultados em média ± SEM e valor de P. Valores de  $P < 0,05$ , são apresentados em vermelho. Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

Na comparação das análises de células espermáticas nos momentos pré e pós-congelação, no grupo com maior suscetibilidade à criopreservação houve maior concentração de todos os metabólitos que apresentaram diferença nas amostras pré-congelação (Tabela 55 e Figuras 123 a 131), com exceção apenas da glutaciona oxidada, com maior concentração nas células pós-congelação (Tabela 55 e Figura 123). Neste grupo apenas três aminoácidos não apresentaram diferença nos tempos: fenilalanina, tirosina e hidroxiprolina. O mesmo padrão foi observado no grupo com menor suscetibilidade à criopreservação, com maior concentração de todos os metabólitos desta classe no momento pré-congelação (Tabela 56 e Figuras 123 a 131), também com exceção da glutaciona oxidada (Tabela 56 e Figura 123).

Tabela 55 - Resultados de peptídeos, aminoácidos e derivados analisados em células espermáticas nos momentos pré e pós-criopreservação do grupo com maior suscetibilidade à criopreservação

Peptídeos, aminoácidos e derivados com PID (concentração em ng/mL)	Grupo Maior Suscetibilidade à Criopreservação		P
	Sêmen <i>in natura</i> (n=8)	Sêmen Criopreservado (n=8)	
	Média±SEM	Média±SEM	
Glutaciona	496,45±30,44	127,18±7,79	<,0001
Ácido aspártico	18,05±0,84	5,16±0,29	<,0001
Ácido glutâmico	3522,34±420,39	135,25±10,86	<,0001
Alanina	381,33±43,22	71,20±7,07	<,0001
Arginina	1413,75±116,35	383,75±25,25	<,0001
Cistina	10,62±0,68	3,00±0,15	<,0001
Fenilalanina	241,96±23,49	212,95±6,12	0,3389
Glicina	33,74±2,10	8,10±0,60	<,0001
Histidina	209,60±23,03	39,28±3,16	<,0001
Isoleucina	258,25±21,31	199,14±15,70	0,0311
Leucina	1053,96±43,41	386,21±32,07	<,0001
Lisina	106,89±5,23	40,18±1,67	<,0001
Metionina	216,55±26,00	22,42±2,16	<,0001
Ornitina	14,38±0,93	2,25±0,23	<,0001
Prolina	264,17±17,68	109,15±4,98	0,0044
Serina	55,08±2,74	9,75±0,62	<,0001
Tirosina	225,95±27,01	210,30±22,18	0,6613
Treonina	7,32±0,79	4,23±0,39	0,0033
Triptofano	185,86±4,30	66,30±2,36	<,0001
Valina	625,85±25,99	176,85±14,42	<,0001
Sulfona de metionina	0,51±0,02	0,49±0,01	0,3428

Peptídeos, aminoácidos e derivados sem PID ( <i>area ratio</i> )	Sêmen <i>in natura</i> (n=8)	Sêmen Criopreservado (n=8)	P
	Média±SEM	Média±SEM	
Glutationa oxidada	0,08±0,01	0,65±0,06	<,0001
Citrulina	3,33±0,08	0,76±0,04	<,0001
Glutamina	3,86±0,19	0,65±0,05	<,0001
Hidroxiprolina	0,12±0,01	0,12±0,01	0,7565
Creatina	9,34±0,72	0,94±0,05	<,0001
Dimetilglicina	112,29±4,83	20,81±0,69	<,0001
Quinurenina	0,55±0,06	0,02±0,00	<,0001

Fonte: Leite (2022)

Metabólitos detectados com PID foram normalizados pelos mesmos e seus dados convertidos em concentração em ng/mL. Metabólitos detectados sem PID foram normalizados com a sulfona de metionina e seus dados estão em *area ratio*. Resultados em média ± SEM e valor de P. Valores de P<0,05, são apresentados em vermelho. Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

Tabela 56 - Resultados de peptídeos, aminoácidos e derivados analisados em células espermáticas nos momentos pré e pós-criopreservação do grupo com menor suscetibilidade à criopreservação

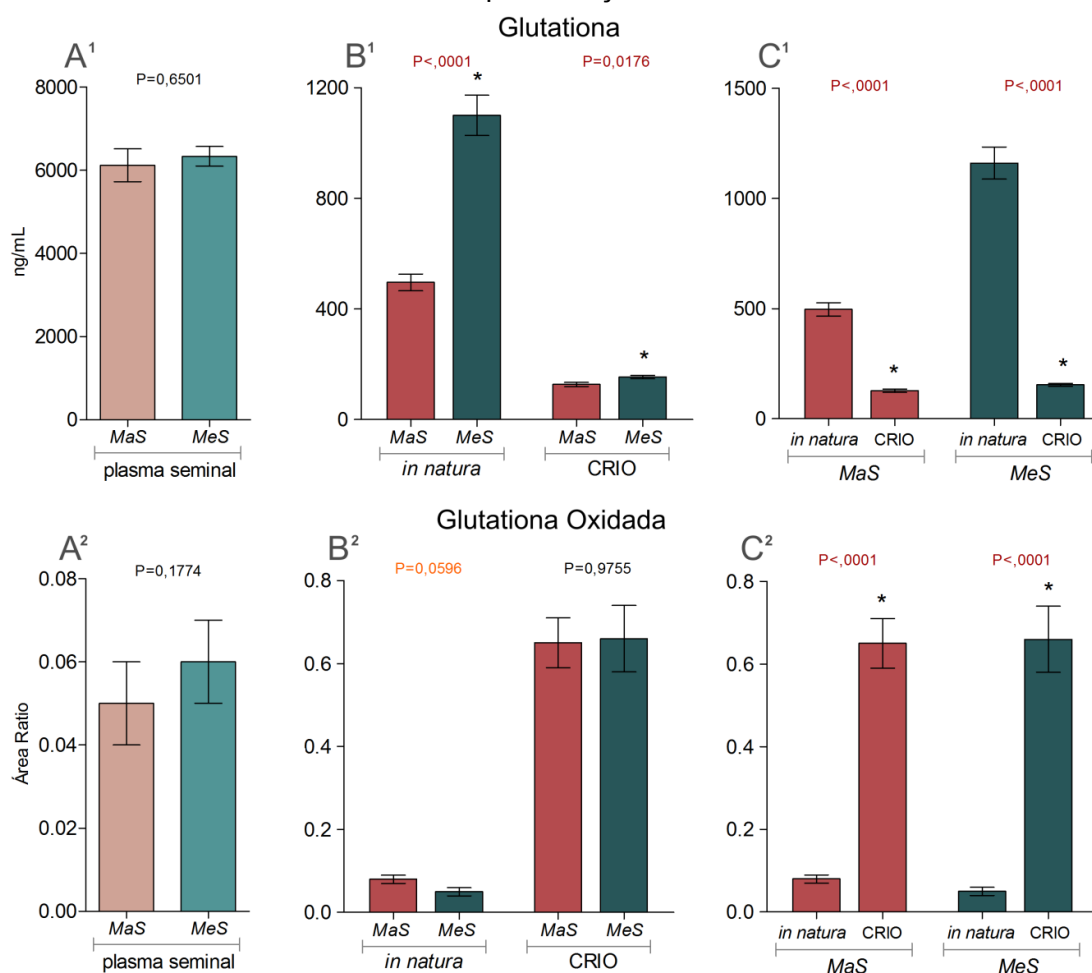
Peptídeos, aminoácidos e derivados com PID (concentração em ng/mL)	Grupo Menor Suscetibilidade à Criopreservação		P
	Sêmen <i>in natura</i> (n=8)	Sêmen Criopreservado (n=8)	
	Média±SEM	Média±SEM	
Glutationa	1160,53±73,13	154,11±6,29	<,0001
Ácido aspártico	44,19±2,94	4,44±0,22	<,0001
Ácido glutâmico	6211,56±464,44	204,53±18,71	<,0001
Alanina	713,49±76,99	60,01±3,94	<,0001
Arginina	3330,40±142,84	254,72±7,49	<,0001
Cistina	11,62±0,71	3,31±0,14	<,0001
Fenilalanina	588,58±44,15	153,48±4,74	<,0001
Glicina	64,37±2,60	5,63±0,42	<,0001
Histidina	461,16±32,87	28,23±2,03	<,0001
Isoleucina	666,61±37,22	135,32±4,39	<,0001
Leucina	2737,14±245,76	246,58±17,87	<,0001
Lisina	190,34±13,76	26,67±2,01	<,0001
Metionina	493,12±27,83	43,25±3,50	<,0001
Ornitina	21,47±0,86	2,76±0,28	<,0001
Prolina	544,96±44,40	168,72±21,87	<,0001
Serina	107,14±3,94	8,89±0,47	<,0001
Tirosina	510,07±27,59	136,24±11,36	<,0001
Treonina	12,51±0,75	5,36±0,27	<,0001
Triptofano	474,70±22,80	48,70±1,46	<,0001
Valina	1059,02±79,15	248,95±22,75	<,0001
Sulfona de metionina	0,60±0,03	0,51±0,01	0,0077

Peptídeos, aminoácidos e derivados sem PID ( <i>area ratio</i> )	Sêmen <i>in natura</i> (n=8)	Sêmen Criopreservado (n=8)	P
	Média±SEM	Média±SEM	
Glutationa oxidada	0,05±0,01	0,66±0,08	<,0001
Citrulina	5,19±0,36	0,41±0,02	<,0001
Glutamina	7,50±0,31	1,02±0,08	<,0001
Hidroxi prolina	0,31±0,01	0,19±0,01	<,0001
Creatina	17,30±0,90	1,03±0,05	<,0001
Dimetilglicina	100,91±4,99	12,88±0,65	<,0001
Quinurenina	1,24±0,06	0,02±0,002	<,0001

Fonte: Leite (2022)

Metabólitos detectados com PID foram normalizados pelos mesmos e seus dados convertidos em concentração em ng/mL. Metabólitos detectados sem PID foram normalizados com a sulfona de metionina e seus dados estão em *area ratio*. Resultados em média ± SEM e valor de P. Valores de  $P < 0,05$ , são apresentados em vermelho. Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

Figura 123 - Gráficos dos resultados das análises de glutaciona e glutaciona oxidada em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

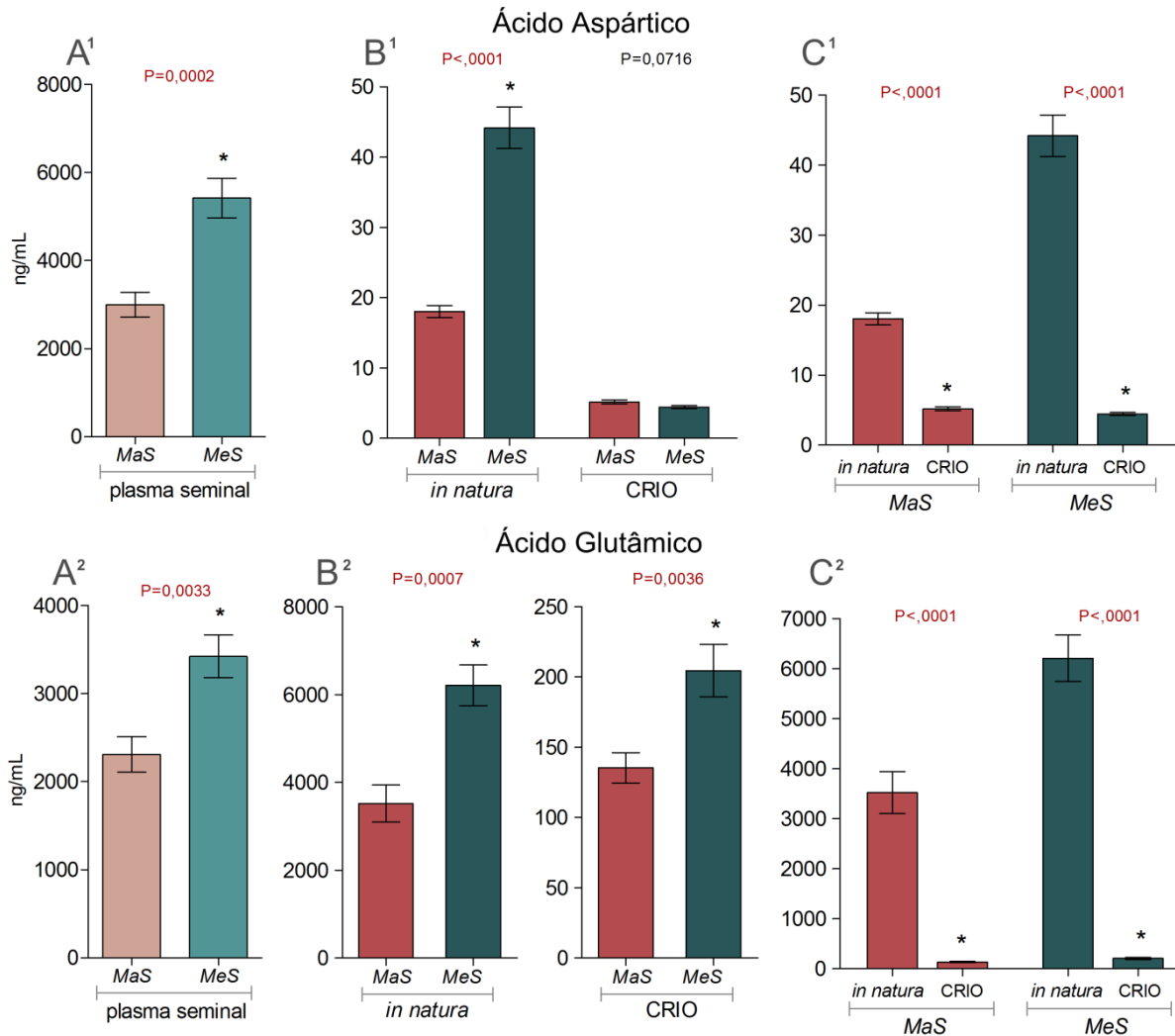


Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de P são apresentados sobre as barras. MaS: grupo com maior

suscetibilidade à criopreservação; *MeS*: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Os superescritos 1 e 2 acima das letras se referem, respectivamente, à glutatona e glutatona oxidada; Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelação (CRIO).

Figura 124 - Gráficos dos resultados das análises dos ácidos aspártico e glutâmico em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

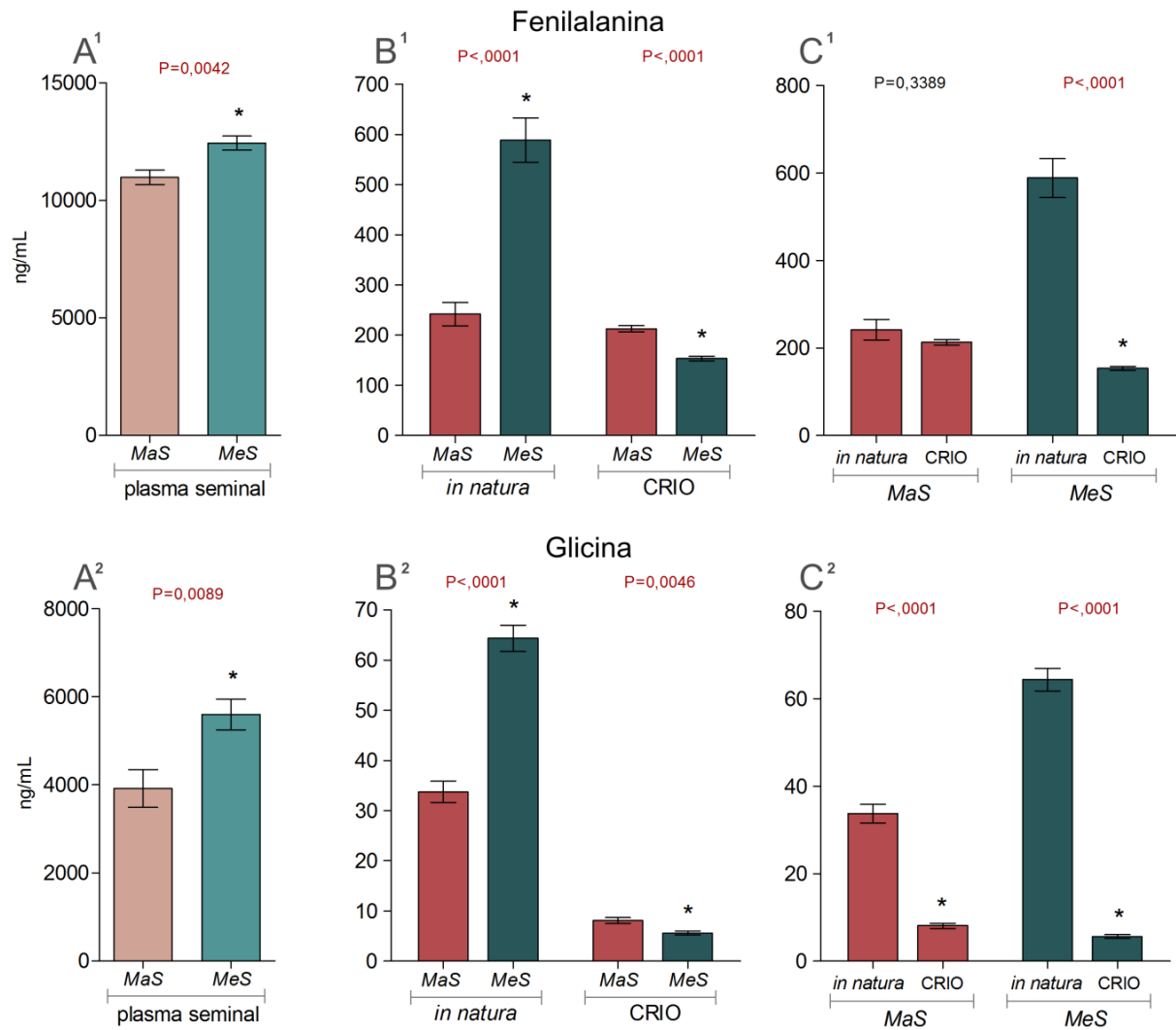


Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de *P* são apresentados sobre as barras. *MaS*: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; *MeS*: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Os superescritos 1 e 2 acima das letras se referem, respectivamente, aos ácidos aspártico e glutâmico; Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelação (CRIO).



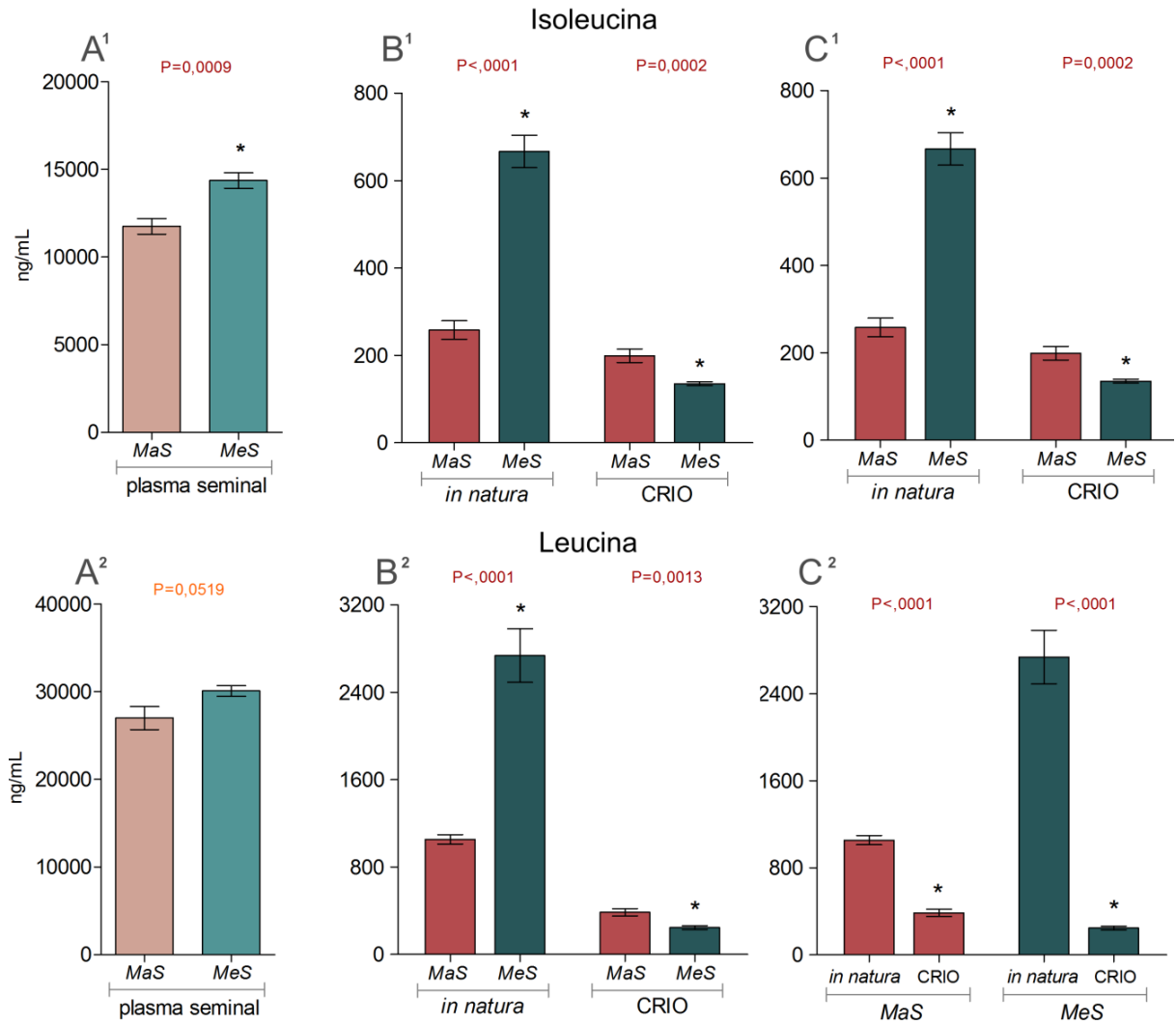
Figura 125 - Gráficos dos resultados das análises dos aminoácidos fenilalanina e glicina em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de *P* são apresentados sobre as barras. *MaS*: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; *MeS*: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Os superescritos 1 e 2 acima das letras se referem, respectivamente, à fenilalanina e glicina; Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelação (CRIO).

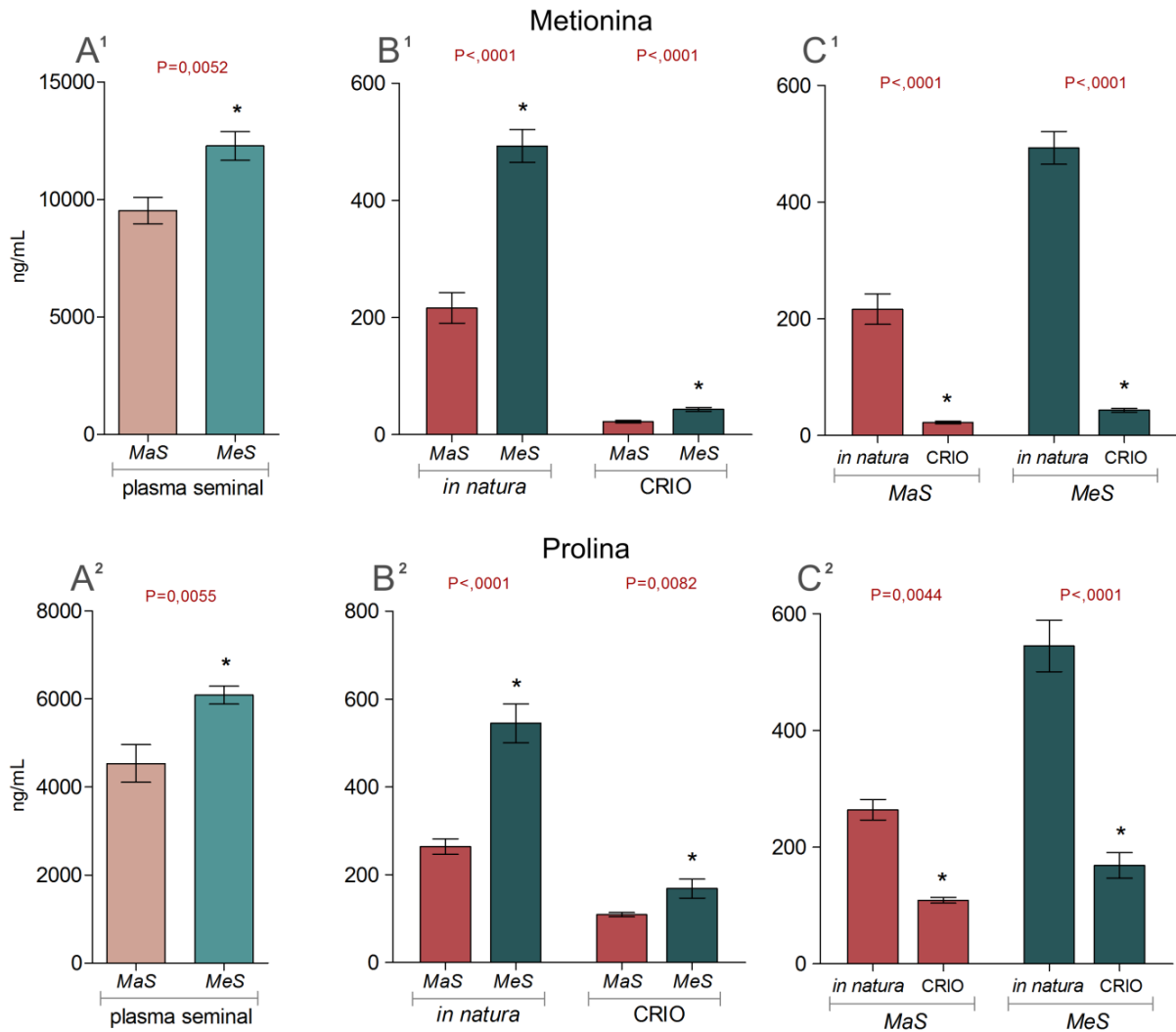
Figura 126 - Gráficos dos resultados das análises dos aminoácidos isoleucina e leucina em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de P são apresentados sobre as barras. MaS: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; MeS: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Os superescritos 1 e 2 acima das letras se referem, respectivamente, à isoleucina e leucina; Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelamento (CRIO).

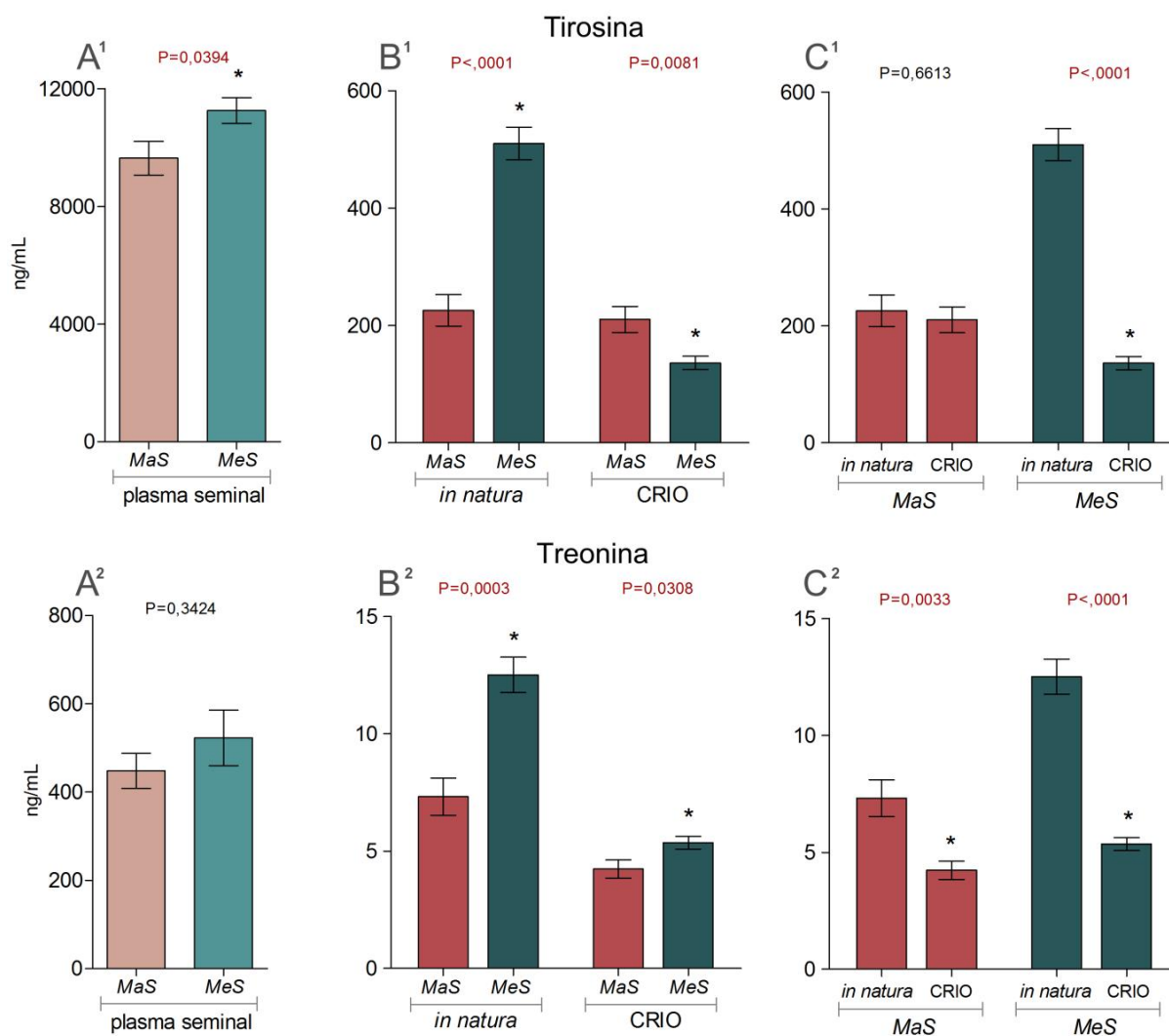
Figura 127 - Gráficos dos resultados das análises dos aminoácidos metionina e prolina em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de P são apresentados sobre as barras. MaS: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; MeS: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Os superescritos 1 e 2 acima das letras se referem, respectivamente, à metionina e prolina; Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelação (CRIO).

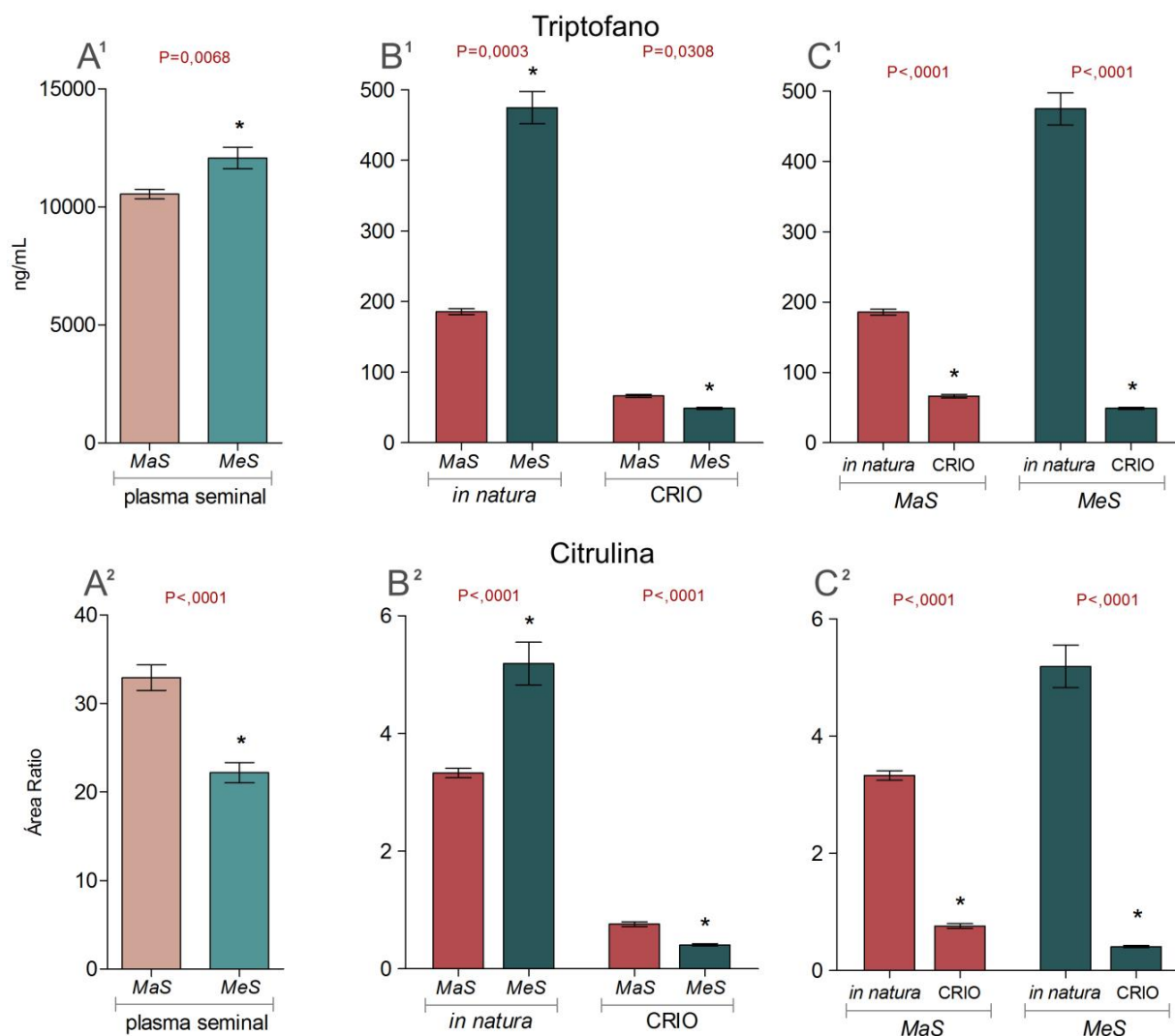
Figura 128 - Gráficos dos resultados das análises dos aminoácidos tirosina e treonina em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de *P* são apresentados sobre as barras. *MaS*: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; *MeS*: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Os superescritos 1 e 2 acima das letras se referem, respectivamente, à tirosina e treonina; Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelamento (CRIO).

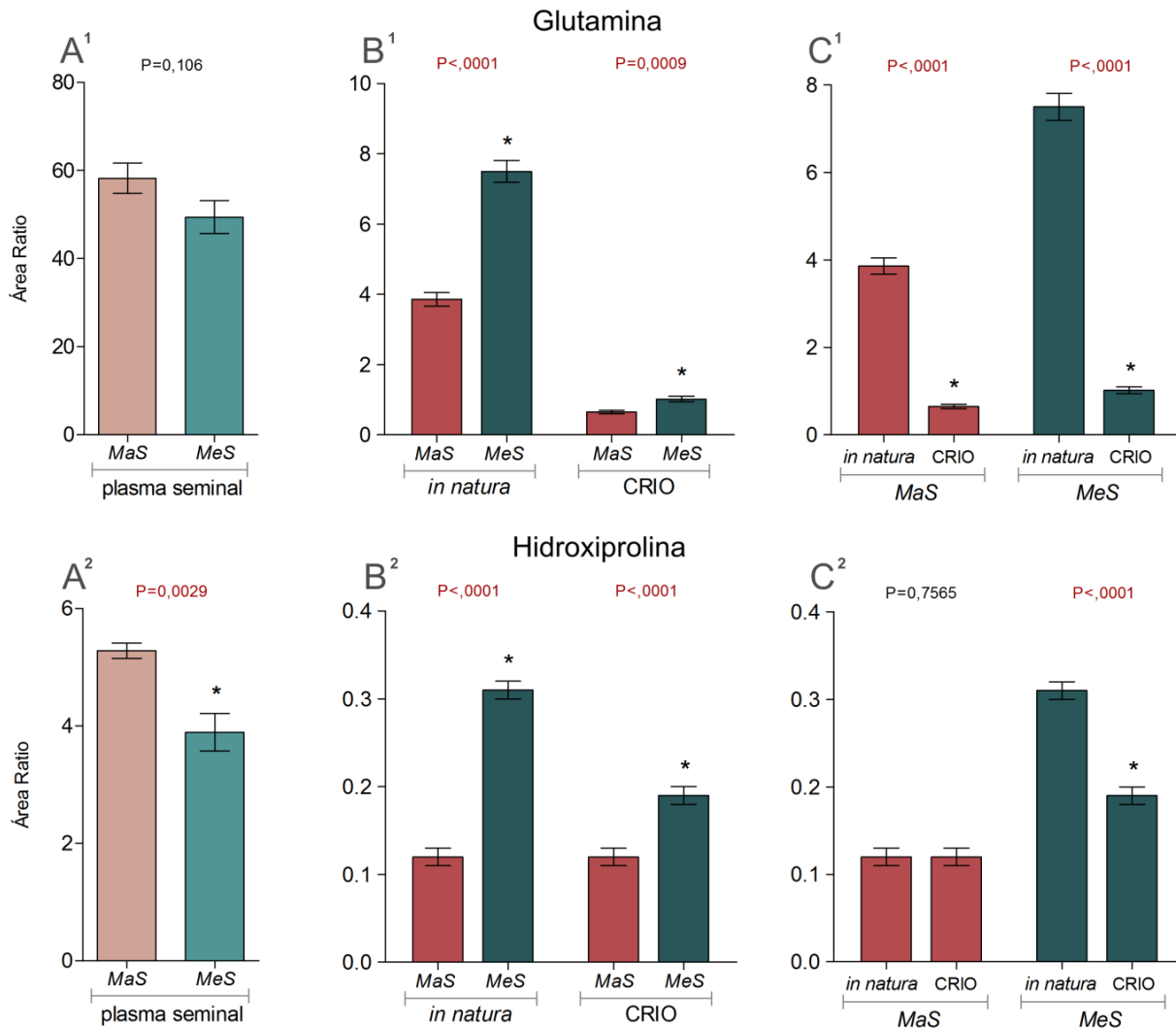
Figura 129 - Gráficos dos resultados das análises dos aminoácidos triptofano e citrulina em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de *P* são apresentados sobre as barras. MaS: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; MeS: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Os superescritos 1 e 2 acima das letras se referem, respectivamente, ao triptofano e à citrulina; Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelação (CRIO).

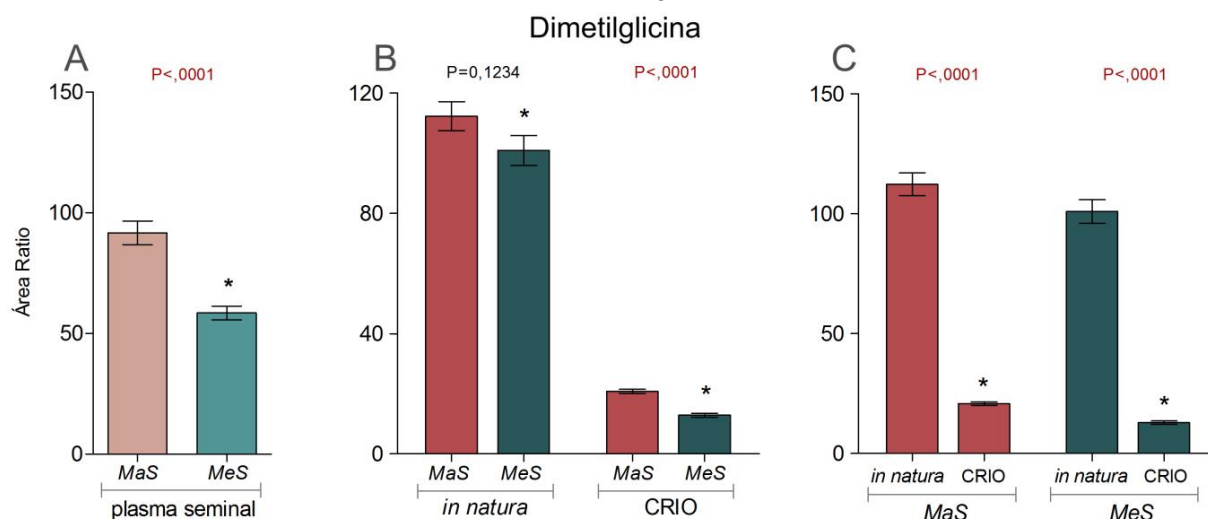
Figura 130 - Gráficos dos resultados das análises dos aminoácidos glutamina e hidroxiprolina em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de *P* são apresentados sobre as barras. MaS: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; MeS: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Os superescritos 1 e 2 acima das letras se referem, respectivamente, à glutamina e hidroxiprolina; Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelamento (CRIO).

Figura 131 - Gráficos dos resultados das análises do derivado de aminoácido dimetilglicina em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



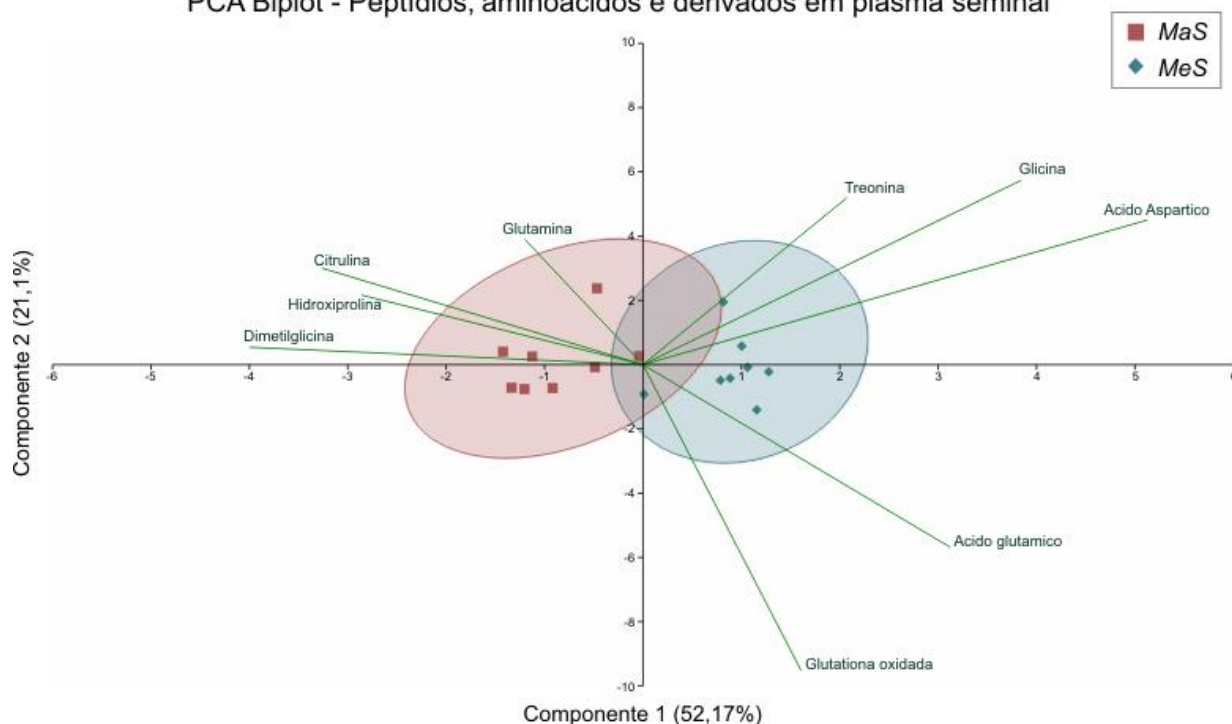
Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de *P* são apresentados sobre as barras. *MaS*: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; *MeS*: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelação (CRIO).

#### 4.4.2.3.2 Resultados de PCA

Os dados de peptídeos, aminoácidos e derivados em plasma seminal foram normalizados e submetidos à PCA, com a seleção de nove metabólitos pelos seus valores de *loadings* (Apêndice 6). Ácido aspártico, dimetilglicina, glicina, citrulina, ácido glutâmico, hidroxiprolina, treonina, glutathiona oxidada e glutamina foram os metabólitos com maior contribuição na resposta de variância entre os grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação. O componente principal 1 foi responsável por 52,17% da variância e o componente principal 2, por 21,10%, totalizando 73,27%. O PCA *biplot* mostra proximidade entre os *clusters* de amostras e sobreposição das elipses de IC (Figura 132). No entanto, pode-se observar que os ácidos aspártico e glutâmico possuem maior influência sobre o grupo *MeS*, enquanto dimetilglicina e citrulina têm maior peso sobre o grupo *MaS* (Figura 132).

Figura 132 – PCA em apresentação *biplot* de peptídeos, aminoácidos e derivados em plasma seminal nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação  
PCA Biplot - Peptídios, aminoácidos e derivados em plasma seminal



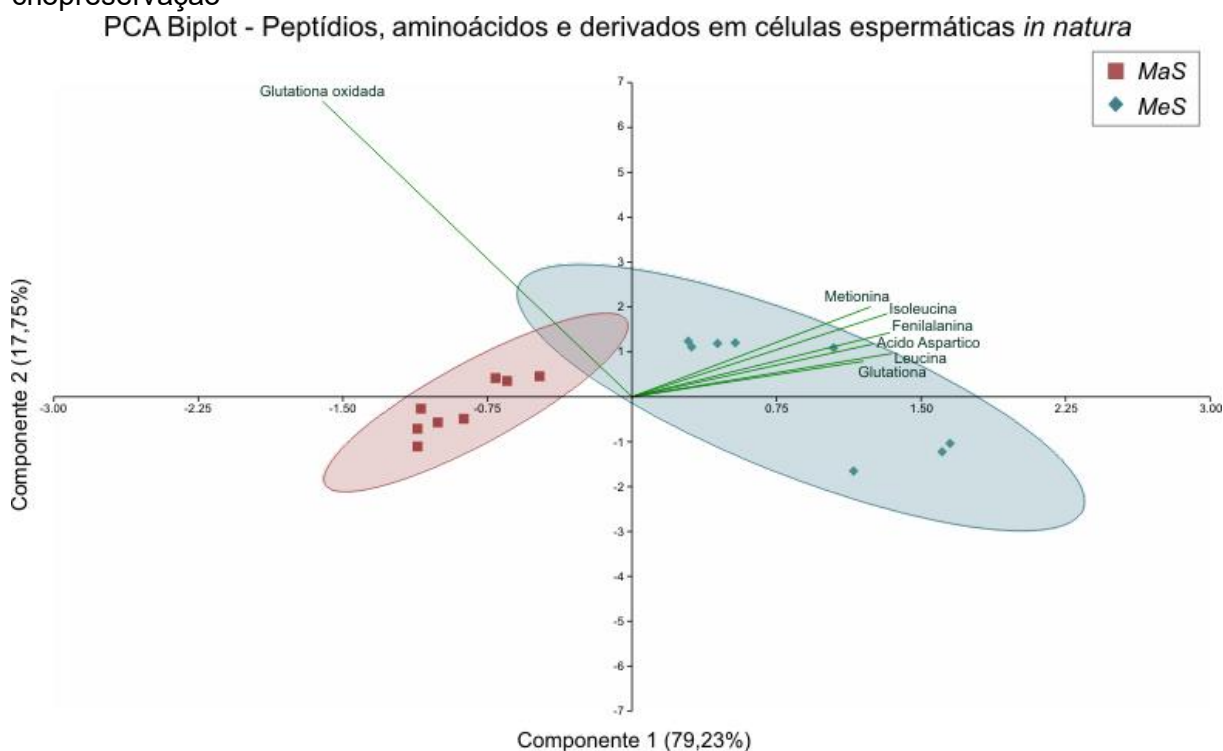
Fonte: Leite (2022)

Representação gráfica da separação entre os grupos com maior (*MaS*) e menor (*MeS*) suscetibilidade à criopreservação com os componentes principais 1 e 2, que respondem por uma variância total de 73,27%. A variância explicada pelos componentes é apresentada entre parênteses. Os *clusters* das amostras dos grupos são indicados conforme a legenda e circundados por elipses IC. As linhas e texto em verde indicam as variáveis selecionadas e a importância das mesmas (escala *eigenvalue*) na variância e separação dos grupos.

Na PCA dos dados de células espermáticas de sêmen *in natura*, sete metabólitos foram selecionados pelos seus valores de *loadings* (Apêndice 6): glutaciona oxidada, leucina, fenilalanina, isoleucina, ácido aspártico, metionina e glutaciona. Os componentes principais 1 e 2, responderam por 79,23% e 17,25%, respectivamente, com um total de 96,98% da variância. O PCA *biplot* mostra uma separação clara entre os *clusters* de amostras e uma pequena sobreposição das elipses de IC (Figura 133). O mesmo indica ainda que a glutaciona oxidada possui maior influência sobre as amostras do grupo *MaS*, enquanto leucina, fenilalanina e isoleucina, sobre o grupo *MeS* (Figura 133).



Figura 133 - PCA em apresentação *biplot* de peptídeos, aminoácidos e derivados em células espermáticas de sêmen *in natura* nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

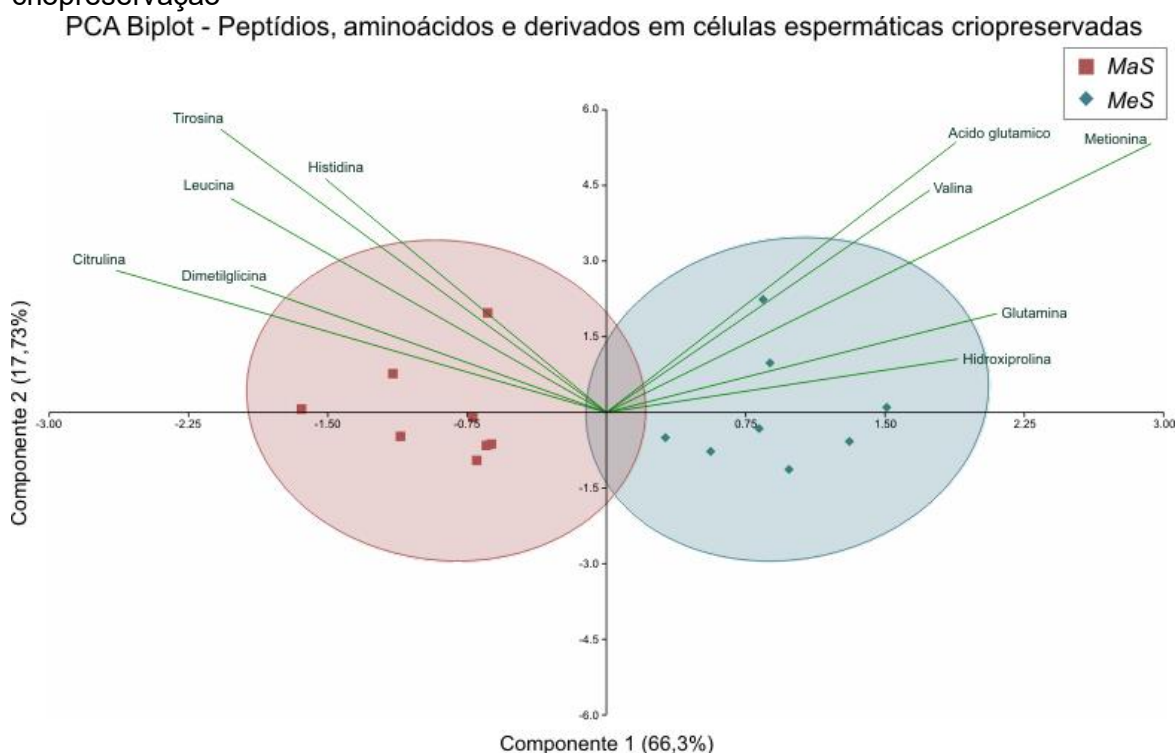


Fonte: Leite (2022)

Representação gráfica da separação entre os grupos com maior (*MaS*) e menor (*MeS*) suscetibilidade à criopreservação com os componentes principais 1 e 2, que respondem por uma variância total de 96,98%. A variância explicada pelos componentes é apresentada entre parênteses. Os *clusters* das amostras dos grupos são indicados conforme a legenda e circundados por elipses de IC. As linhas e texto em verde indicam as variáveis selecionadas e a importância das mesmas (escala eigenvalue) na variância e separação dos grupos.

Na PCA de células espermáticas de sêmen criopreservado, 10 metabólitos foram selecionados pelos seus valores de *loadings* (Apêndice 6): metionina, citrulina, glutamina, tirosina, leucina, hidroxiprolina, dimetilglicina, ácido glutâmico, valina e histidina. A resposta da variância dos componentes 1 e 2 foi de 66,3% e 17,73%, respectivamente, totalizando 84,03%. Houve separação dos clusters de amostras dos grupos com pequena sobreposição das elipses de IC (Figura 134). O PCA *biplot* mostra uma clara separação entre os metabólitos que influenciaram a variância de cada grupo, com metionina, glutamina e ácido glutâmico com maior importância sobre o grupo *MeS*, e citrulina, tirosina e leucina sobre o grupo *MaS* (Figura 134).

Figura 134 - PCA em apresentação *biplot* de peptídeos, aminoácidos e derivados em células espermáticas de sêmen criopreservado nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

Representação gráfica da separação entre os grupos com maior (*MaS*) e menor (*MeS*) suscetibilidade à criopreservação com os componentes principais 1 e 2, que respondem por uma variância total de 84,03%. A variância explicada pelos componentes é apresentada entre parênteses. Os *clusters* das amostras dos grupos são indicados conforme a legenda e circundados por elipses de IC. As linhas e texto em verde indicam as variáveis selecionadas e a importância das mesmas (escala eigenvalue) na variância e separação dos grupos.

#### 4.4.2.4 Ácidos Orgânicos

Ácidos orgânicos são moléculas essenciais na fisiologia das células espermáticas, com papel fundamental no metabolismo energético, atuando ainda como antioxidantes, compostos intermediários e na sinalização celular. Nesta classe, os metabólitos detectados com PID próprio foram normalizados pela área e concentração do mesmo, e seus dados convertidos em concentração em ng/mL. Ácidos orgânicos detectados sem PID foram normalizados pela área do pico do ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico (2NMES) detectado em cada amostra e seus dados são apresentados em *area ratio*. Os resultados abrangem as diferenças entre os grupos estudados nas diferentes amostras biológicas e PCA, apresentados abaixo em dois tópicos distintos.

#### 4.4.2.4.1 Diferenças entre os grupos

Nas análises de plasma seminal, 12 ácidos orgânicos foram detectados, com diferença entre os grupos estudados em oito deles. O grupo com menor suscetibilidade à criopreservação apresentou maior concentração dos ácidos láctico, málico, pirúvico e succínico (Tabela 57 e Figuras 136 a 139). No grupo com maior suscetibilidade à criopreservação, foi observada maior *area ratio* dos ácidos  $\alpha$ -aminobutírico, cítrico, isocítrico e nicotínico (Tabela 57 e Figuras 140, 143 e 144). Os ácidos nicotínico e fumárico foram detectados apenas no plasma seminal.

Tabela 57 - Resultados de ácidos orgânicos analisados em plasma seminal dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

Ácidos Orgânicos com PID (concentração em ng/mL)	Plasma Seminal		P
	Maior suscetibilidade à criopreservação (MaS / n=8)	Menor suscetibilidade à criopreservação (MeS / n=8)	
	Média±SEM	Média±SEM	
Ácido $\alpha$ -cetoglutárico	1333,35±38,60	1265,45±22,45	0,1506
Ácido Láctico	406867,71±13138,36	467628,58±11520,67	0,0037
Ácido Málico	7061,23±402,57	11454,24±207,00	<,0001
Ácido Pirúvico	2369,52±60,83	2672,39±99,85	0,0214
Ácido Succínico	21677,61±1252,88	34296,91±1088,86	<,0001

Ácidos Orgânicos sem PID ( <i>area ratio</i> )	Maior suscetibilidade à criopreservação (MaS / n=8)	Menor suscetibilidade à criopreservação (MeS / n=8)	P
	Média±SEM	Média±SEM	
	Ácido $\alpha$ -aminobutírico	86,05±3,85	
Ácido Adenilsuccínico	0,09±0,01	0,07±0,01	0,2428
Ácido Cítrico	51063,92±3696,47	28037,13±1790,85	<,0001
Ácido Isocítrico	884,36±43,32	593,99±48,44	0,0005
Ácido Fumárico	3,05±0,22	3,04±0,15	0,9721
Ácido Nicotínico	4,82±0,39	3,71±0,16	0,0167
Acido Pantotênico	62,43±4,34	59,35±2,93	0,5655

Fonte: Leite (2022)

Ácidos orgânicos detectados com PID foram normalizados pelos mesmos e seus dados convertidos em concentração em ng/mL. Ácidos orgânicos detectados sem PID foram normalizados com 2NMES (Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico) e seus dados estão em *area ratio*. Resultados em média  $\pm$  SEM e valor de P. Valores de  $P < 0,05$ , são apresentados em vermelho. Médias  $\pm$  SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

Quanto à análise das amostras de células espermáticas em sêmen *in natura*, entre os 11 ácidos orgânicos detectados, foi observada maior quantidade em oito deles no grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Neste grupo houve maior concentração dos ácidos láctico, málico e succínico (Tabela 58 e Figuras 136, 137 e 139), e maior *area ratio* dos ácidos  $\alpha$ -aminobutírico,  $\gamma$ -aminobutírico, cítrico,

isocítrico e pantotênico (Tabela 58 e Figuras 140, 141 e 143 a 145). Em contrapartida, apenas os ácidos pirúvico e adenilsuccínico apresentaram maior concentração e *area ratio*, respectivamente, no grupo com maior suscetibilidade à criopreservação (Tabela 58 e Figuras 138 e 142).

Tabela 58 - Resultados de ácidos orgânicos analisados em células espermáticas de sêmen *in natura* dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

Ácidos Orgânicos com PID (concentração em ng/mL)	Sêmen <i>in natura</i>		P
	Maior suscetibilidade à criopreservação (MaS / n=8)	Menor suscetibilidade à criopreservação (MeS / n=8)	
	Média±SEM	Média±SEM	
Ácido α-cetoglutárico	714,73±36,83	625,36±32,57	0,0941
Ácido Lático	36963,12±2124,21	58561,43±2162,08	<,0001
Ácido Málico	323,90±35,01	716,20±39,81	<,0001
Ácido Pirúvico	18,40±1,51	11,59±0,52	0,0004
Ácido Succínico	127,70±7,36	162,62±6,63	0,0033
Ácidos Orgânicos sem PID ( <i>area ratio</i> )	Maior suscetibilidade à criopreservação (MaS / n=8)	Menor suscetibilidade à criopreservação (MeS / n=8)	P
	Média±SEM	Média±SEM	
Ácido α-aminobutírico	16,91±0,50	27,46±1,02	<,0001
Ácido γ-aminobutírico	2,60±0,15	3,03±0,11	0,0358
Ácido Adenilsuccínico	2,60±0,07	1,77±0,07	<,0001
Ácido Cítrico	1194,57±72,61	2606,67±170,16	<,0001
Ácido Isocítrico	7,36±0,28	21,88±1,18	<,0001
Acido Pantotênico	0,88±0,08	1,68±0,17	0,0003

Fonte: Leite (2022)

Ácidos orgânicos detectados com PID foram normalizados pelos mesmos e seus dados convertidos em concentração em ng/mL. Ácidos orgânicos detectados sem PID foram normalizados com 2NMES (Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico) e, seus dados estão em *area ratio*. Resultados em média ± SEM e valor de P. Valores de P<0,05, são apresentados em vermelho. Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

O padrão observado nas células espermáticas pré-congelação foi alterado nas análises pós-congelação para os ácidos orgânicos, como já observado anteriormente em outras classes de metabólitos. Os resultados das análises de células espermáticas em sêmen criopreservado mostram que o grupo com menor suscetibilidade à criopreservação manteve apenas maior concentração e *area ratio* dos ácidos succínico, γ-aminobutírico e cítrico (Tabela 59 e Figuras 139, 141 e 143). Por outro lado, o grupo com maior suscetibilidade à criopreservação teve maior concentração dos ácidos α-cetoglutárico, málico e pirúvico (Tabela 59 e Figuras 135, 137 e 138), e maior *area ratio* dos ácidos α-aminobutírico, adenilsuccínico, isocítrico e pantotênico (Tabela 59 e Figuras 140, 142, 144 e 145).

Tabela 59 - Resultados de ácidos orgânicos analisados em células espermáticas de sêmen criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

Ácidos Orgânicos com PID (concentração em ng/mL)	Sêmen Criopreservado		P
	Maior suscetibilidade à criopreservação (MaS / n=8)	Menor suscetibilidade à criopreservação (MeS / n=8)	
	Média±SEM	Média±SEM	
Ácido α-cetoglutárico	546,88±35,73	302,62±14,63	<,0001
Ácido Lático	16964,60±1103,27	16013,05±972,32	0,5281
Ácido Málico	82,98±3,83	67,33±5,65	0,0379
Ácido Pirúvico	266,24±19,71	172,09±8,06	0,0003
Ácido Succínico	219,02±8,02	293,06±13,43	0,0003
Ácidos Orgânicos sem PID (area ratio)	Maior suscetibilidade à criopreservação (MaS / n=8)	Menor suscetibilidade à criopreservação (MeS / n=8)	P
	Média±SEM	Média±SEM	
Ácido α-aminobutírico	1,40±0,09	0,97±0,05	0,001
Ácido γ-aminobutírico	16,32±0,62	24,75±1,18	<,0001
Ácido Adenilsuccínico	141,94±9,48	113,47±2,75	0,0156
Ácido Isocítrico	13,58±0,81	8,28±0,49	<,0001
Ácido Cítrico	1414,79±151,21	2461,85±112,50	<,0001
Acido Pantotênico	16,01±0,59	11,30±0,46	<,0001

Fonte: Leite (2022)

Ácidos orgânicos detectados com PID foram normalizados pelos mesmos e seus dados convertidos em concentração em ng/mL. Ácidos orgânicos detectados sem PID foram normalizados com 2NMES (Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico) e seus dados estão em *area ratio*. Resultados em média ± SEM e valor de P. Valores de  $P < 0,05$ , são apresentados em vermelho. Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

Quanto aos resultados da análise dos grupos *MaS* e *MeS* em relação aos momentos pré e pós-congelação, os dois grupos apresentaram maior quantidade dos ácidos α-cetoglutárico, lático, málico e α-aminobutírico (Tabelas 60 e 61 e Figuras 135 a 137 e 140), e menor quantidade dos ácidos pirúvico, succínico, γ-aminobutírico, adenilsuccínico e pantotênico (Tabelas 60 e 61 e Figuras 138, 139, 141, 142 e 145), nas células de sêmen *in natura*. A única diferença no padrão dos ácidos orgânicos nos momentos pré e pós-congelação entre os grupos está no ácido isocítrico, que apresentou aumento no grupo *MaS* e redução no grupo *MeS* (Tabelas 60 e 61 e Figura 144).

Tabela 60 - Resultados de ácidos orgânicos analisados em células espermáticas nos momentos pré e pós-criopreservação do grupo com maior suscetibilidade à criopreservação

Ácidos Orgânicos com PI (concentração em ng/mL)	Grupo Maior Suscetibilidade à Criopreservação		P
	Sêmen <i>in natura</i> (n=8)	Sêmen Criopreservado (n=8)	
	Média±SEM	Média±SEM	
Ácido α-cetoglutárico	714,73±36,83	546,88±35,73	0,0067
Ácido Láctico	36963,12±2124,21	16964,60±1103,27	<,0001
Ácido Málico	323,90±35,01	82,98±3,83	<,0001
Ácido Pirúvico	18,40±1,51	266,24±19,71	<,0001
Ácido Succínico	127,70±7,36	219,02±8,02	<,0001
Ácidos Orgânicos sem PI ( <i>area ratio</i> )	Sêmen <i>in natura</i> (n=8)	Sêmen Criopreservado (n=8)	P
	Média±SEM	Média±SEM	
	Ácido α-aminobutírico	16,91±0,50	
Ácido γ-aminobutírico	2,60±0,15	16,32±0,62	<,0001
Ácido Adenilsuccínico	2,60±0,07	141,94±9,48	<,0001
Ácido Isocítrico	7,36±0,28	13,58±0,81	<,0001
Ácido Cítrico	1194,57±72,61	1414,79±151,21	0,2288
Acido Pantotênico	0,88±0,08	16,01±0,59	<,0001

Fonte: Leite (2022)

Ácidos orgânicos detectados com PID foram normalizados pelos mesmos e seus dados convertidos em concentração em ng/mL. Ácidos orgânicos detectados sem PID foram normalizados com 2NMES (Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico) e seus dados estão em *area ratio*. Resultados em média ± SEM e valor de P. Valores de P<0,05, são apresentados em vermelho. Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

Tabela 61 - Resultados de ácidos orgânicos analisados em células espermáticas nos momentos pré e pós-criopreservação do grupo com menor suscetibilidade à criopreservação

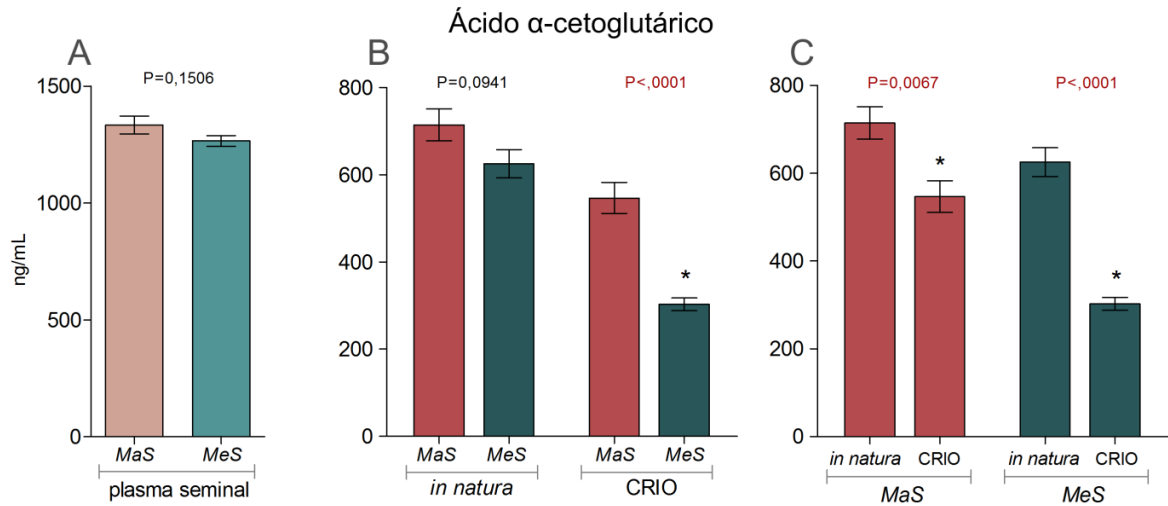
Ácidos Orgânicos com PI (concentração em ng/mL)	Grupo Menor Suscetibilidade à Criopreservação		P
	Sêmen <i>in natura</i> (n=8)	Sêmen Criopreservado (n=8)	
	Média±SEM	Média±SEM	
Ácido α-cetoglutárico	625,36±32,57	302,62±14,63	<,0001
Ácido Láctico	58561,43±2162,08	16013,05±972,32	<,0001
Ácido Málico	716,20±39,81	67,33±5,65	<,0001
Ácido Pirúvico	11,59±0,52	172,09±8,06	<,0001
Ácido Succínico	162,62±6,63	293,06±13,43	<,0001
Ácidos Orgânicos sem PI ( <i>area ratio</i> )	Sêmen <i>in natura</i> (n=8)	Sêmen Criopreservado (n=8)	P
	Média±SEM	Média±SEM	
	Ácido α-aminobutírico	27,46±1,02	
Ácido γ-aminobutírico	3,03±0,11	24,75±1,18	<,0001
Ácido Adenilsuccínico	1,77±0,07	113,47±2,75	<,0001
Ácido Isocítrico	21,88±1,18	8,28±0,49	<,0001
Ácido Cítrico	2606,67±170,16	2461,85±112,50	0,4894
Acido Pantotênico	1,68±0,17	11,30±0,46	<,0001

Fonte: Leite (2022)

Ácidos orgânicos detectados com PID foram normalizados pelos mesmos e seus dados convertidos em concentração em ng/mL. Ácidos orgânicos detectados sem PID foram normalizados com 2NMES (Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico) e seus dados estão em *area ratio*. Resultados em média ± SEM

e valor de  $P$ . Valores de  $P < 0,05$ , são apresentados em vermelho. Médias  $\pm$  SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

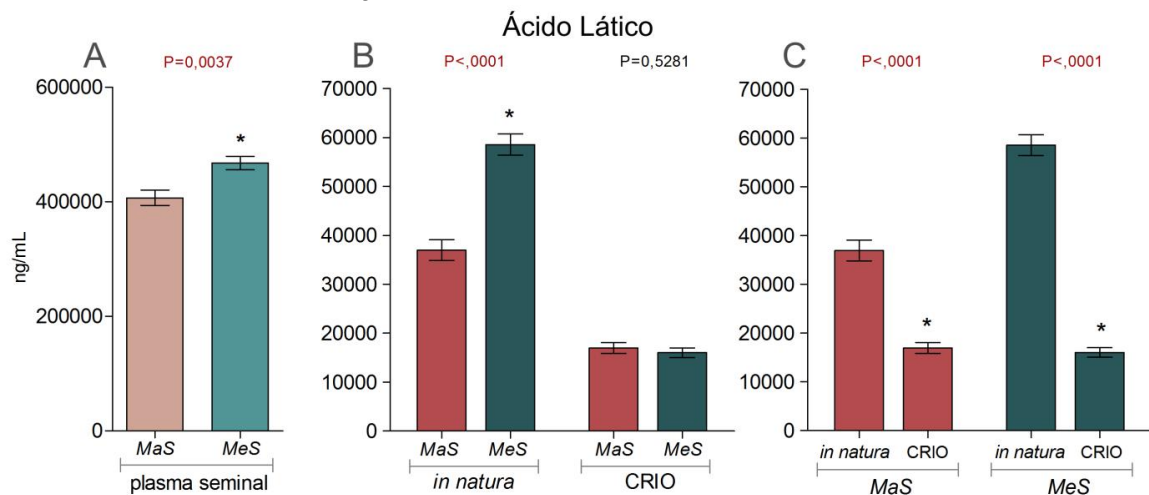
Figura 135 - Gráficos dos resultados das análises do ácido  $\alpha$ -cetoglúterico em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de  $P$  são apresentados sobre as barras. MaS: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; MeS: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelação (CRIO).

Figura 136 - Gráficos dos resultados das análises do ácido láctico em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

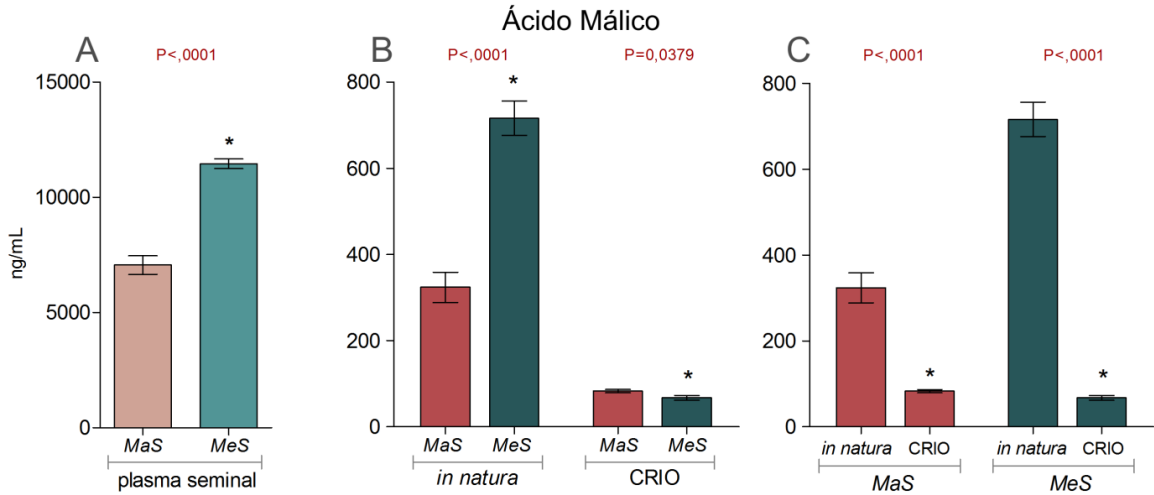


Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de  $P$  são apresentados sobre as barras. MaS: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; MeS: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células

espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelação (CRIO).

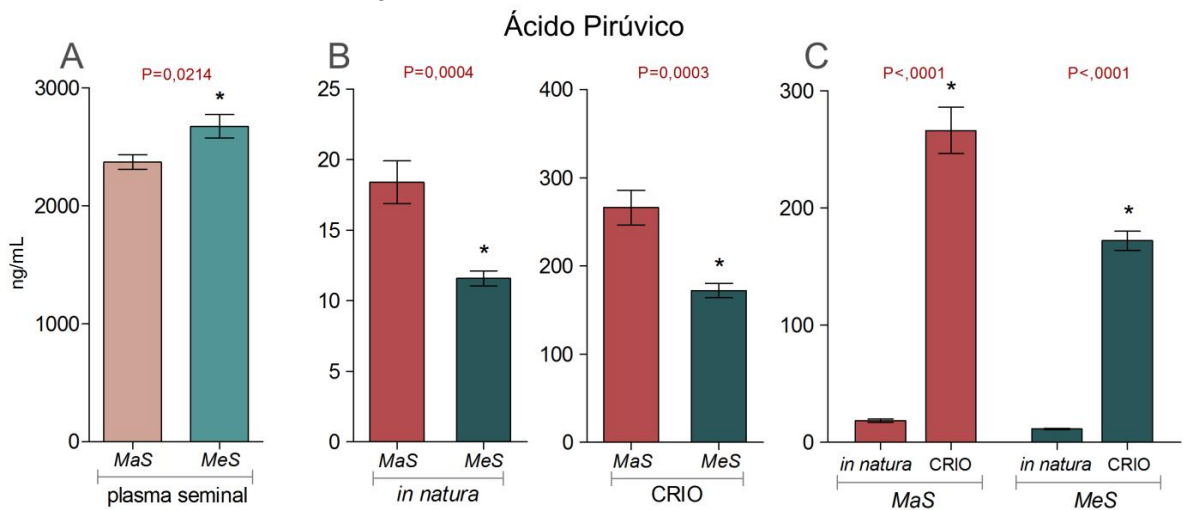
Figura 137 - Gráficos dos resultados das análises do ácido málico em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de P são apresentados sobre as barras. MaS: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; MeS: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelação (CRIO).

Figura 138 - Gráficos dos resultados das análises do ácido pirúvico em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



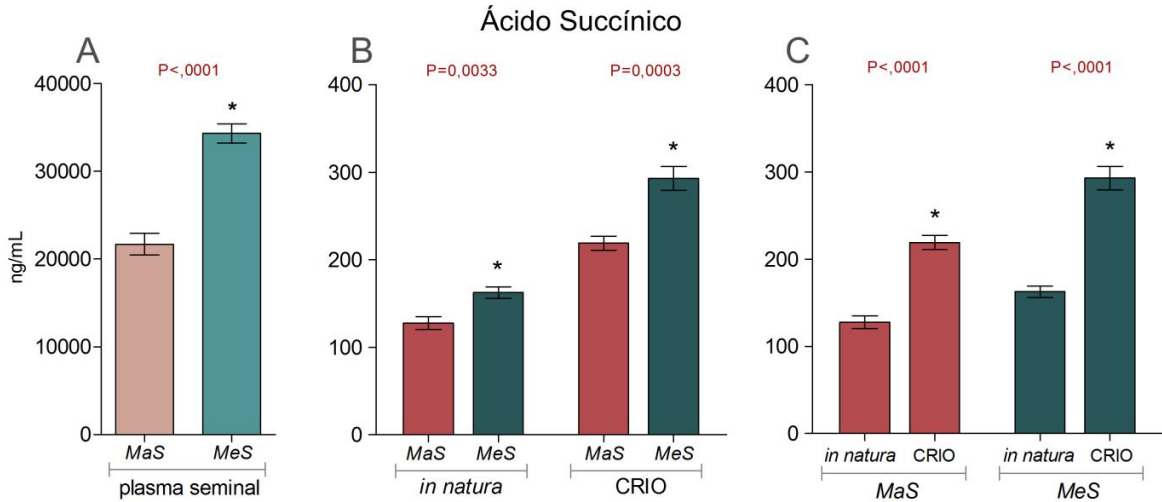
Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de P são apresentados sobre as barras. MaS: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; MeS: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células



espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelação (CRIO).

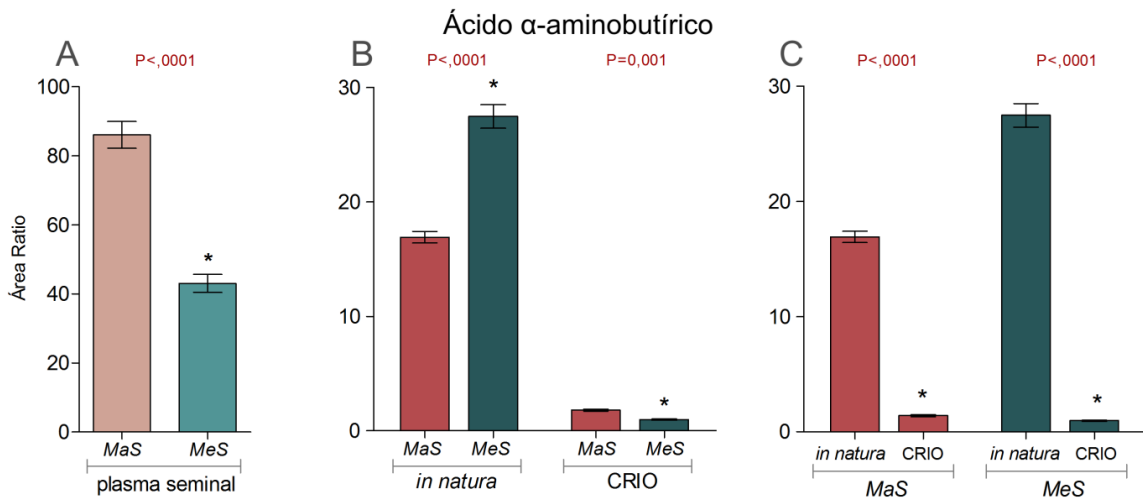
Figura 139 - Gráficos dos resultados das análises do ácido succínico em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de P são apresentados sobre as barras. MaS: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; MeS: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelação (CRIO).

Figura 140 - Gráficos dos resultados das análises do ácido  $\alpha$ -aminobutírico em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

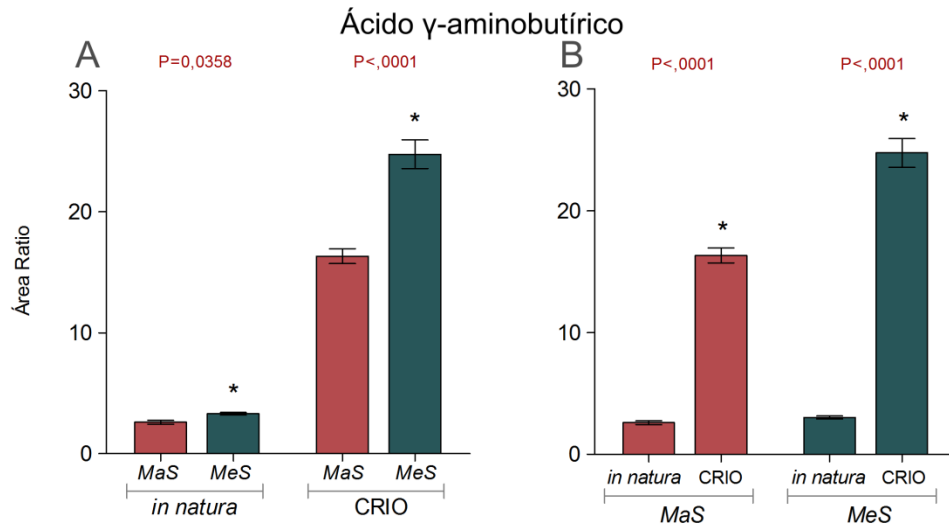


Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de P são apresentados sobre as barras. MaS: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; MeS: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células

espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelação (CRIO).

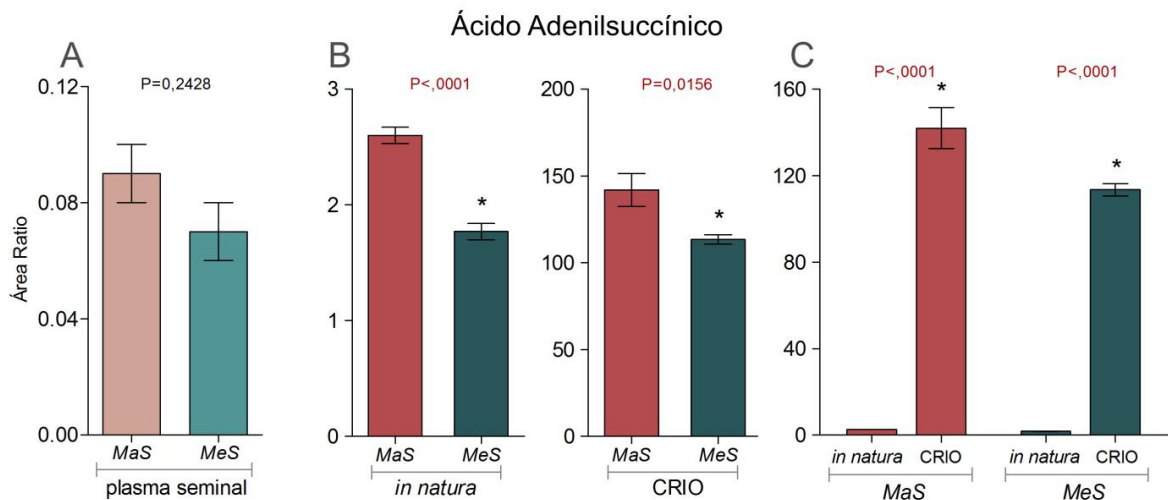
Figura 141 - Gráficos dos resultados das análises do ácido  $\gamma$ -aminobutírico em células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de  $P$  são apresentados sobre as barras. MaS: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; MeS: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Em A: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em B: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelação (CRIO).

Figura 142 - Gráficos dos resultados das análises do ácido adenilsuccínico em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

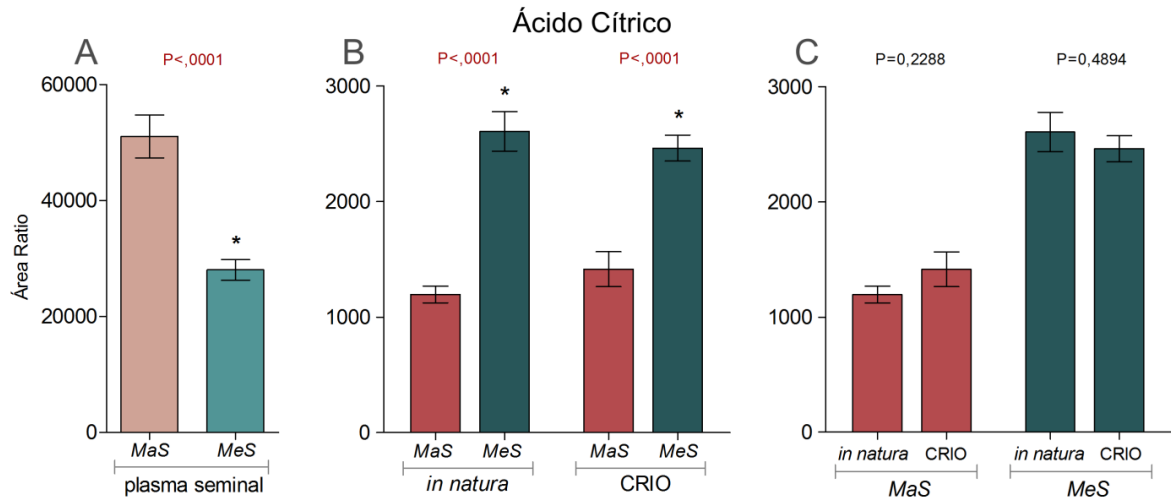


Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de  $P$  são apresentados sobre as barras. MaS: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; MeS: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células

espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelação (CRIO).

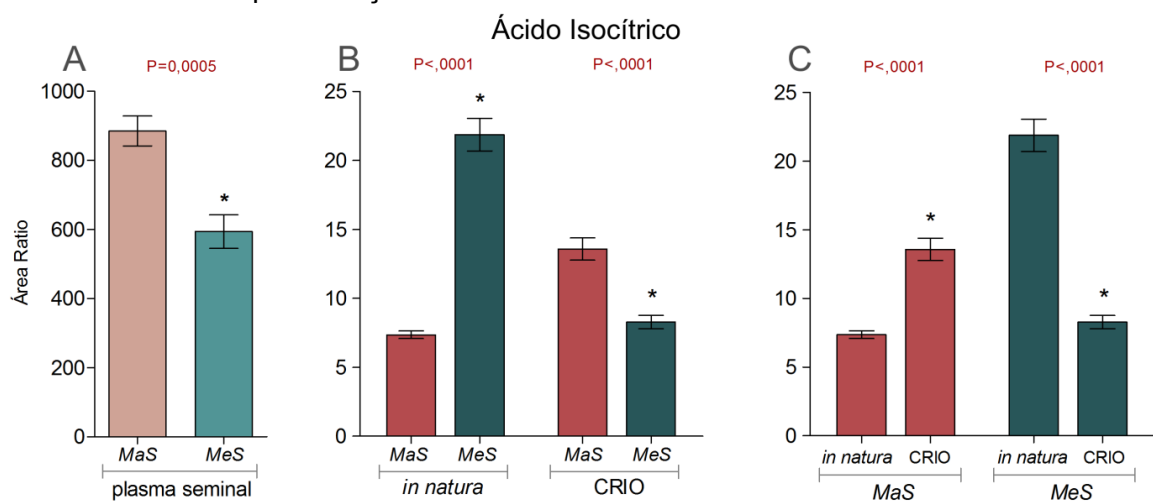
Figura 143 - Gráficos dos resultados das análises do ácido cítrico em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de P são apresentados sobre as barras. MaS: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; MeS: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelação (CRIO).

Figura 144 - Gráficos dos resultados das análises do ácido isocítrico em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

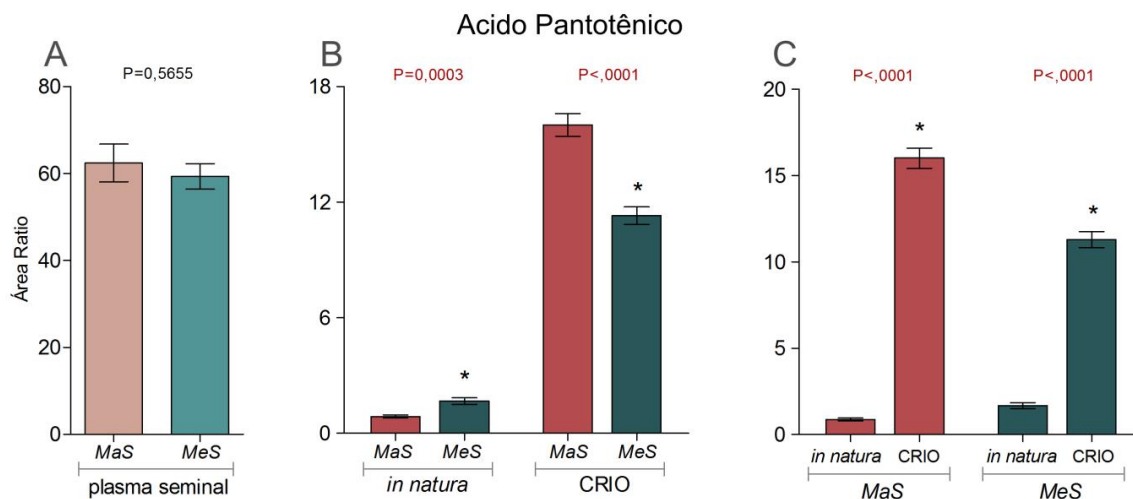


Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de P são apresentados sobre as barras. MaS: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; MeS: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células

espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelação (CRIO).

Figura 145 - Gráficos dos resultados das análises do ácido pantotênico em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



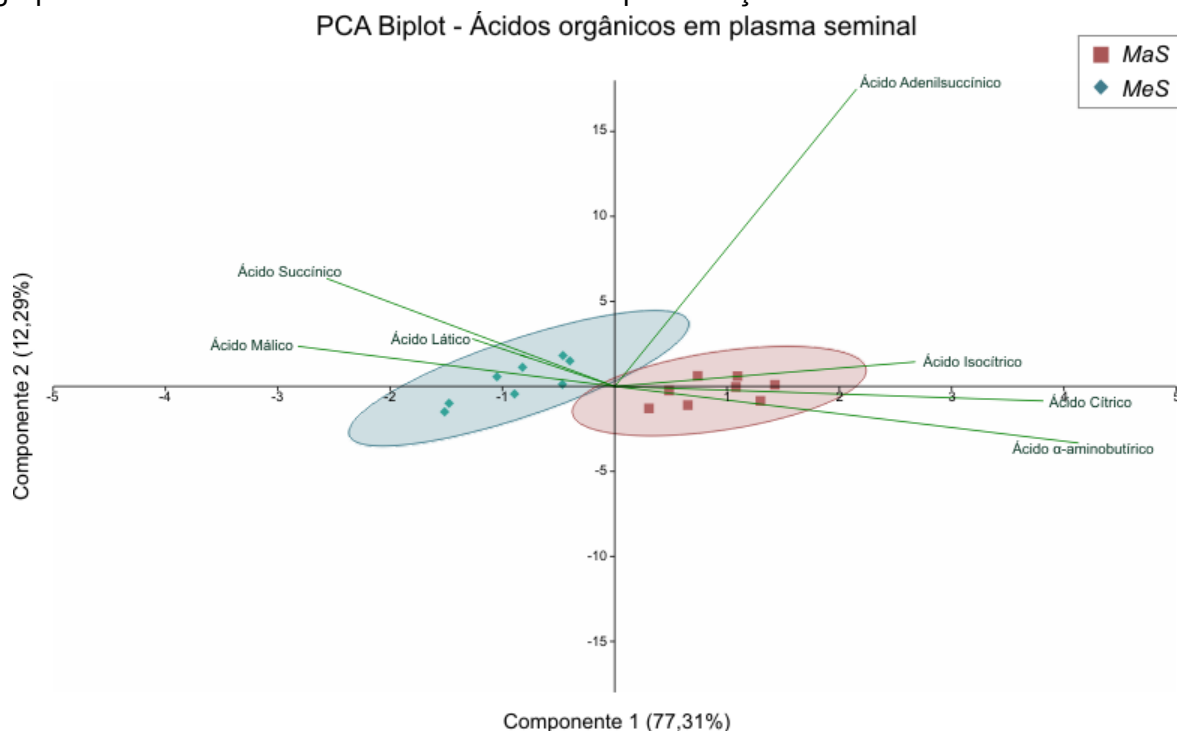
Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de *P* são apresentados sobre as barras. *MaS*: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; *MeS*: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelação (CRIO).

#### 4.4.2.4.2 Resultados de PCA

Como nos demais metabólitos, os dados de ácidos orgânicos foram normalizados antes de submetidos à PCA. No plasma seminal, sete metabólitos foram selecionados pelos seus valores de *loadings* (Apêndice 6). Os ácidos  $\alpha$ -aminobutírico, cítrico, málico, isocítrico, succínico, láctico e adenilsuccínico foram os que mais contribuíram na resposta de variância entre os grupos. O componente principal 1 foi responsável por 77,31% da variância e o componente principal 2, por 12,29%, totalizando 89,6%. O PCA *biplot* mostra uma separação entre os *clusters* de amostras e há apenas um tangenciamento das elipses de IC (Figura 146). Houve uma maior influência dos ácidos  $\alpha$ -aminobutírico e cítrico sobre o grupo *MaS*, enquanto os ácidos málico e succínico têm maior peso sobre o grupo *MeS* (Figura 146).

Figura 146 - PCA em apresentação *biplot* de ácidos orgânicos em plasma seminal nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

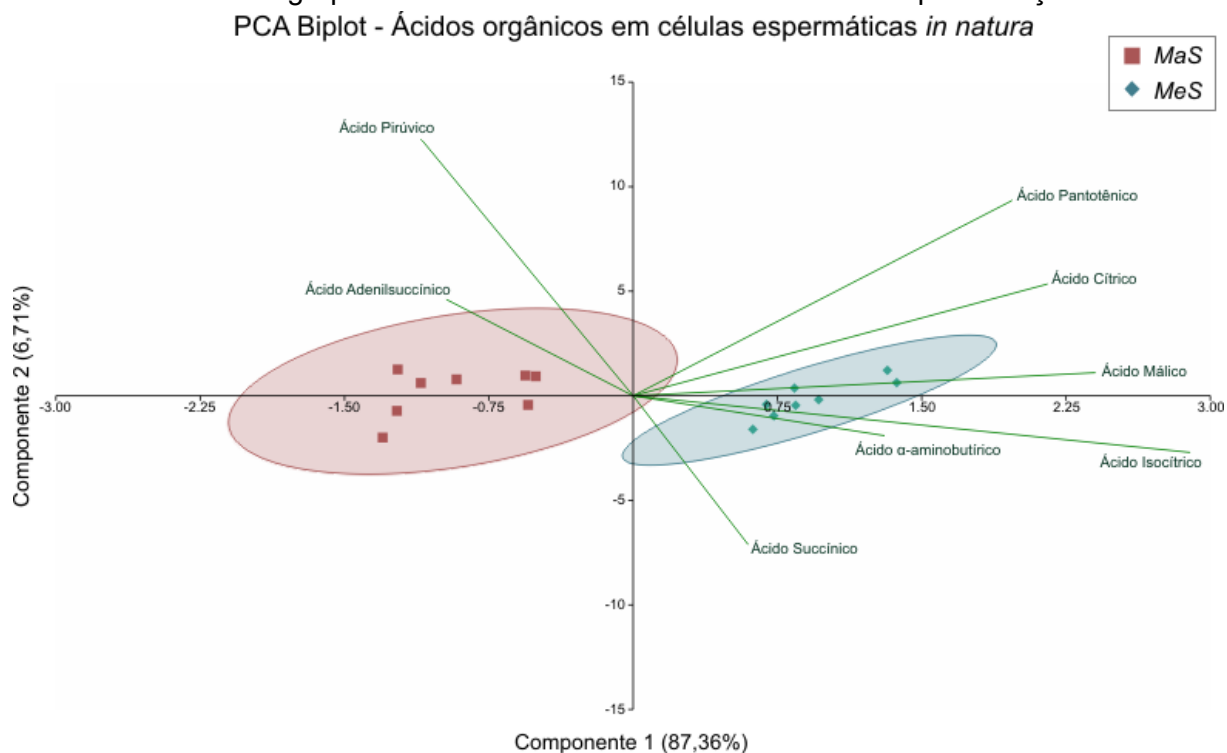


Fonte: Leite (2022)

Representação gráfica da separação entre os grupos com maior (*MaS*) e menor (*MeS*) suscetibilidade à criopreservação com os componentes principais 1 e 2, que respondem por uma variância total de 89,6%. A variância explicada pelos componentes é apresentada entre parênteses. Os *clusters* das amostras dos grupos são indicados conforme a legenda e circundados por elipses de IC. As linhas e texto em verde indicam as variáveis selecionadas e a importância das mesmas (escala *eigenvalue*) na variância e separação dos grupos.

Na PCA dos dados de células espermáticas de sêmen *in natura*, oito ácidos orgânicos foram selecionados pelos seus valores de *loadings* (Apêndice 6). Os metabólitos com maiores *loadings* foram os ácidos isocítrico, málico, cítrico, pantotênico,  $\alpha$ -aminobutírico, pirúvico, adenilsuccínico e succínico. Os componentes principais 1 e 2, responderam por 87,36% e 6,71% da variância, respectivamente, com um total de 94,07%. O PCA *biplot* mostra separação clara entre os *clusters* de amostras e elipses de IC (Figura 147). O mesmo mostra ainda que os ácidos pirúvico e adenilsuccínico possuem maior influência sobre as amostras do grupo *MaS*, e os ácidos isocítrico e málico sobre o grupo *MeS* (Figura 147).

Figura 147 - PCA em apresentação *biplot* de ácidos orgânicos em células espermáticas de sêmen *in natura* nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

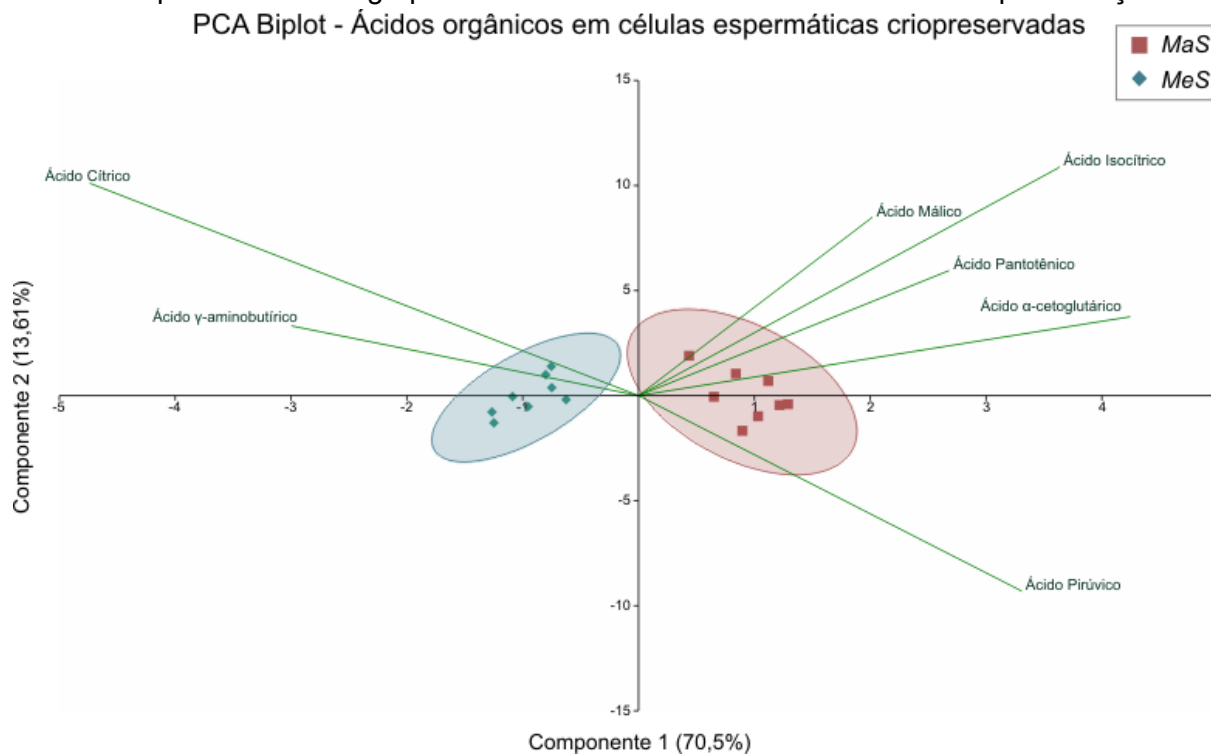


Fonte: Leite (2022)

Representação gráfica da separação entre os grupos com maior (*MaS*) e menor (*MeS*) suscetibilidade à criopreservação com os componentes principais 1 e 2, que respondem por uma variância total de 94,07%. A variância explicada pelos componentes é apresentada entre parênteses. Os *clusters* das amostras dos grupos são indicados conforme a legenda e circundados por elipses de IC. As linhas e texto em verde indicam as variáveis selecionadas e a importância das mesmas (escala *eigenvalue*) na variância e separação dos grupos.

Sete ácidos orgânicos foram selecionados pelos seus valores de *loadings* (Apêndice 6) na PCA de células espermáticas de sêmen criopreservado, os ácidos cítrico,  $\alpha$ -cetoglutárico, isocítrico, pirúvico,  $\gamma$ -aminobutírico, pantotênico e málico. A resposta da variância dos componentes 1 e 2 foi de 70,5% e 13,61%, respectivamente, totalizando 84,11%. Houve separação dos *clusters* de amostras dos grupos, bem como das elipses de IC (Figura 148). O PCA *biplot* mostra uma clara separação entre os ácidos orgânicos que mais influenciaram a variância de cada grupo, com destaque para os ácidos cítrico e  $\gamma$ -aminobutírico sobre o grupo *MeS*, e  $\alpha$ -cetoglutárico, isocítrico e pirúvico sobre o grupo *MaS* (Figura 148). Nos resultados de PCA, foi observado que, em todas as amostras biológicas, os ácidos cítrico, isocítrico e málico foram variáveis que tiveram maior influência na variação dos grupos.

Figura 148 - PCA em apresentação *biplot* de ácidos orgânicos em células espermáticas de sêmen criopreservado nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

Representação gráfica da separação entre os grupos com maior (*MaS*) e menor (*MeS*) suscetibilidade à criopreservação com os componentes principais 1 e 2, que respondem por uma variância total de 84,11%. A variância explicada pelos componentes é apresentada entre parênteses. Os *clusters* das amostras dos grupos são indicados conforme a legenda e circundados por elipses de IC. As linhas e texto em verde indicam as variáveis selecionadas e a importância das mesmas (escala *eigenvalue*) na variância e separação dos grupos.

#### 4.4.2.5 Nucleobases, nucleosídeos, nucleotídeos e demais metabólitos

Entre os demais metabólitos detectados nos métodos *target*, estão nucleobases, nucleosídeos, nucleotídeos, derivados purínicos e metabólitos que são precursores importantes de componentes do metabolismo celular. Esta categoria constitui, portanto, metabólitos que são essenciais na formação de ácidos nucleicos e que atuam no metabolismo energético das células espermáticas. Como em outras classes apresentadas neste estudo, metabólitos detectados com PID próprio, foram normalizados pela área e concentração do mesmo, e seus dados convertidos em concentração em ng/mL. No entanto, a maior parte dos metabólitos desta categoria foi detectada na ausência de PID e foram normalizados pela área do pico do ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico (2NMES), detectado em cada amostra, com seus dados apresentados em *area ratio*. Os resultados abrangem as diferenças entre os

grupos estudados nas diferentes amostras biológicas e PCA, apresentados abaixo em dois tópicos distintos.

#### 4.4.2.5.1 Diferenças entre os grupos

Na análise realizada em plasma seminal foram detectados 17 metabólitos, sendo observada diferença entre os grupos em oito deles. O grupo com menor suscetibilidade à criopreservação apresentou maior concentração das nucleobases adenosina e guanosina (Tabela 62 e Figuras 149 e 151) e maior *area ratio* de xantina e ácido úrico (Tabela 62 e Figuras 154 e 155). No grupo *MaS*, foram observadas maiores quantidades de monofosfato de guanosina (GMP), mononucleotídeo de flavina (FMN), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e hipoxantina (Tabela 62 e Figuras 151, 152 e 154).

Tabela 62 - Resultados de metabólitos analisados em plasma seminal dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

Classe	Metabólito com PID (concentração em ng/mL)	Plasma Seminal		P
		Maior suscetibilidade à criopreservação ( <i>MaS</i> / <i>n=8</i> )	Menor suscetibilidade à criopreservação ( <i>MeS</i> / <i>n=8</i> )	
		Média±SEM	Média±SEM	
nucleobase (purina)	Adenina	1102,52±41,98	1182,44±45,10	0,2156
nucleosídeo (purina)	Adenosina	716,44±45,44	948,66±39,01	0,0017
nucleosídeo (purina)	Guanosina	4283,26±371,52	5665,37±472,75	0,0374
oxidação da trimetilamina	N-óxido de trimetilamina	290,54±19,15	320,60±13,52	0,2206
Classe	Metabólito sem PID ( <i>area ratio</i> )	Maior suscetibilidade à criopreservação ( <i>MaS</i> / <i>n=8</i> )	Menor suscetibilidade à criopreservação ( <i>MeS</i> / <i>n=8</i> )	P
		Média±SEM	Média±SEM	
		Média±SEM	Média±SEM	
nucleotídeo (purina)	Monofosfato de Adenosina (AMP)	12,49±0,93	13,81±0,93	0,3301
nucleotídeo (purina)	AMP cíclico	1,54±0,12	1,48±0,09	0,6961
nucleotídeo (pirimidina)	Monofosfato de Citidina (CMP)	2,69±0,27	2,51±0,17	0,5649
nucleotídeo (purina)	Monofosfato de Guanosina (GMP)	1,79±0,12	1,03±0,09	0,0001
mononucleotídeo	Mononucleotídeo de Flavina (FMN)	0,37±0,05	0,22±0,03	0,0197
coenzima	Flavina adenina dinucleotídeo (FAD)	9,24±0,24	5,72±0,20	<,0001
nucleosídeo (purina)	Inosina	2284,33±207,48	1806,35±241,27	0,1553
nucleosídeo (pirimidina)	Uridina	36,03±1,93	32,96±0,86	0,1682
base purínica	Xantina	3,68±0,37	5,02±0,41	0,0286
derivado purínico	Hipoxantina	108,99±6,73	80,54±3,42	0,0009
derivado purínico	Ácido úrico	0,74±0,06	1,45±0,10	<,0001
oxidação do ácido úrico	Alantoína	0,21±0,02	0,17±0,01	0,1049
piridinocarboxamida	Nicotinamida (vitamina B3)	286,85±18,02	298,12±21,25	0,6919

Fonte: Leite (2022)

Metabólitos detectados com PID foram normalizados pelos mesmos e seus dados convertidos em concentração em ng/mL. Metabólitos detectados sem PID foram normalizados com 2NMES (Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico) e seus dados estão em *area ratio*. Resultados em média ± SEM e valor



de *P*. Valores de  $P < 0,05$ , são apresentados em vermelho. Médias $\pm$ SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

Quanto à análise das amostras de células espermáticas em sêmen *in natura*, houve diferença em 14 dos metabólitos detectados, com o grupo com menor suscetibilidade à criopreservação apresentando maior quantidade em 13 deles. Nesse grupo, houve maior concentração de adenina, adenosina e N-óxido de trimetilamina e maior *area ratio* de monofosfato de adenosina (AMP), monofosfato de guanosina (GMP), mononucleotídeo de flavina (FMN), inosina, uridina, xantina, hipoxantina, ácido úrico, colina e nicotinamida (Tabela 63 e Figuras 149 a 157). Em contrapartida, no grupo *MaS* foi observada apenas maior quantidade de flavina adenina dinucleotídeo (FAD) (Tabela 63 e Figura 152).

Tabela 63 - Resultados de metabólitos analisados em células espermáticas de sêmen *in natura* dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

Metabólito com PID (concentração em ng/mL)	Sêmen <i>in natura</i>		<i>P</i>
	Maior suscetibilidade à criopreservação ( <i>MaS</i> / <i>n</i> =8)	Menor suscetibilidade à criopreservação ( <i>MeS</i> / <i>n</i> =8)	
	Média $\pm$ SEM	Média $\pm$ SEM	
Adenina	71,48 $\pm$ 4,26	96,21 $\pm$ 7,14	0,01
Adenosina	84,80 $\pm$ 3,22	102,77 $\pm$ 3,83	0,0029
Guanosina	507,19 $\pm$ 21,11	499,86 $\pm$ 15,84	0,7852
N-óxido de trimetilamina	81,19 $\pm$ 4,49	166,87 $\pm$ 6,68	<,0001
Metabólito sem PID ( <i>area ratio</i> )	Maior suscetibilidade à criopreservação ( <i>MaS</i> / <i>n</i> =8)	Menor suscetibilidade à criopreservação ( <i>MeS</i> / <i>n</i> =8)	<i>P</i>
	Média $\pm$ SEM	Média $\pm$ SEM	
Monofosfato de Adenosina (AMP)	6,62 $\pm$ 0,65	13,52 $\pm$ 0,79	<,0001
AMP cíclico	1,54 $\pm$ 0,12	1,48 $\pm$ 0,09	0,6961
Monofosfato de Citidina (CMP)	0,26 $\pm$ 0,01	0,28 $\pm$ 0,02	0,4462
Monofosfato de Guanosina (GMP)	0,38 $\pm$ 0,07	0,76 $\pm$ 0,11	0,0064
Mononucleotídeo de Flavina (FMN)	0,51 $\pm$ 0,02	0,64 $\pm$ 0,03	0,0065
Flavina adenina dinucleotídeo (FAD)	0,53 $\pm$ 0,02	0,17 $\pm$ 0,01	<,0001
Inosina	116,01 $\pm$ 6,68	266,95 $\pm$ 5,37	<,0001
Uridina	0,66 $\pm$ 0,05	1,34 $\pm$ 0,04	<,0001
Xantina	0,09 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01	0,0084
Hipoxantina	0,99 $\pm$ 0,06	2,36 $\pm$ 0,14	<,0001
Ácido úrico	0,19 $\pm$ 0,02	0,35 $\pm$ 0,02	0,0002
Colina	1,46 $\pm$ 0,06	2,27 $\pm$ 0,07	<,0001
Nicotinamida (vitamina B3)	2,99 $\pm$ 0,12	8,93 $\pm$ 0,33	<,0001

Fonte: Leite (2022)

Metabólitos detectados com PID foram normalizados pelos mesmos e seus dados convertidos em concentração em ng/mL. Metabólitos detectados sem PID foram normalizados com 2NMES (Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico) e seus dados estão em *area ratio*. Resultados em média  $\pm$  SEM e valor de *P*. Valores de  $P < 0,05$ , são apresentados em vermelho. Médias $\pm$ SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

Nas células espermáticas criopreservadas, os resultados mostram que o grupo com menor suscetibilidade à criopreservação manteve maior *area ratio* de AMP, GMP, uridina, xantina, hipoxantina, ácido úrico e colina, apresentando ainda maior *area ratio* para FAD (Tabela 64 e Figuras 150 a 156). O grupo com maior suscetibilidade à criopreservação teve maior concentração de guanosina e N-óxido de trimetilamina (Tabela 64 e Figura 151), e maior *area ratio* de AMP cíclico, inosina e nicotinamida (Tabela 64 e Figuras 150, 153 e 157).

Tabela 64 - Resultados de metabólitos analisados em células espermáticas de sêmen criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

Metabólito com PID (concentração em ng/mL)	Sêmen Criopreservado		P
	Maior suscetibilidade à criopreservação (MaS / n=8)	Menor suscetibilidade à criopreservação (MeS / n=8)	
	Média±SEM	Média±SEM	
Adenina	683,97±42,04	619,76±51,49	0,3504
Adenosina	2690,14±102,48	2518,61±114,93	0,2841
Guanosina	392,54±31,58	278,93±28,22	0,0179
N-óxido de trimetilamina	20,15±0,43	14,75±0,66	<,0001
Metabólito sem PID ( <i>area ratio</i> )	Maior suscetibilidade à criopreservação (MaS / n=8)	Menor suscetibilidade à criopreservação (MeS / n=8)	P
	Média±SEM	Média±SEM	
Monofosfato de Adenosina (AMP)	22,87±0,85	98,09±3,35	<,0001
AMP cíclico	2,98±0,17	2,22±0,13	0,0036
Monofosfato de Citidina (CMP)	0,07±0,01	0,06±0,01	0,2591
Monofosfato de Guanosina (GMP)	6,36±0,58	9,47±0,62	0,0026
Mononucleotídeo de Flavina (FMN)	1,52±0,09	1,60±0,08	0,5602
Flavina adenina dinucleotídeo (FAD)	0,27±0,02	0,40±0,03	0,0027
Inosina	41,29±1,13	22,24±0,67	<,0001
Uridina	1,92±0,06	2,25±0,10	0,0143
Xantina	0,53±0,03	0,81±0,03	<,0001
Hipoxantina	1,47±0,06	2,09±0,04	<,0001
Ácido úrico	0,12±0,003	0,15±0,01	0,0002
Colina	34,08±0,76	47,63±1,98	<,0001
Nicotinamida (vitamina B3)	6,06±0,24	3,91±0,20	<,0001

Fonte: Leite (2022)

Metabólitos detectados com PID foram normalizados pelos mesmos e seus dados convertidos em concentração em ng/mL. Metabólitos detectados sem PID foram normalizados com 2NMES (Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico) e seus dados estão em *area ratio*. Resultados em média ± SEM e valor de P. Valores de P<0,05, são apresentados em vermelho. Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

Quanto aos resultados da análise dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação em relação aos momentos pré e pós-congelação, os dois grupos possuem um padrão semelhante, com diferença em apenas três

metabólitos. Os dois grupos apresentam maior quantidade de guanósina, N-óxido de trimetilamina, monofosfato de citidina (CMP), inosina e ácido úrico nas células pré-congelação (Tabelas 65 e 66 e Figuras 151, 153 e 155), e maior quantidade de adenina, adenosina, AMP, AMP cíclico, GMP, FMN, uridina, xantina e colina nas células pós-congelação (Tabelas 65 e 66 e Figuras 149 a 154 e 156). Há diferença entre os grupos quanto à hipoxantina e nicotinamida que no grupo *MaS* há maior *area ratio* nas células criopreservadas, e no grupo *MeS* não há diferença para a primeira e há mais nicotinamida nas células *in natura* (Tabelas 65 e 66 e Figuras 154 e 157). A outra diferença se refere à flavina adenina dinucleotídeo (FAD), com maior quantidade nas células *in natura* no grupo *MaS* e nas células criopreservadas no grupo *MeS* (Tabelas 65 e 66 e Figura 152).

Tabela 65 - Resultados de metabólitos analisados em células espermáticas nos momentos pré e pós-criopreservação do grupo com maior suscetibilidade à criopreservação

Metabólito com PID (concentração em ng/mL)	Grupo Maior Suscetibilidade à Criopreservação		P
	Sêmen <i>in natura</i> (n=8)	Sêmen Criopreservado (n=8)	
	Média±SEM	Média±SEM	
Adenina	71,48±4,26	683,97±42,04	<,0001
Adenosina	84,80±3,22	2690,14±102,48	<,0001
Guanósina	507,19±21,11	392,54±31,58	0,0092
N-óxido de trimetilamina	81,19±4,49	20,15±0,43	<,0001
Metabólito sem PID ( <i>area ratio</i> )	Sêmen <i>in natura</i> (n=8)	Sêmen Criopreservado (n=8)	P
	Média±SEM	Média±SEM	
Monofosfato de Adenosina (AMP)	6,62±0,65	22,87±0,85	<,0001
AMP cíclico	0,70±0,06	2,98±0,17	<,0001
Monofosfato de Citidina (CMP)	0,26±0,01	0,07±0,01	<,0001
Monofosfato de Guanósina (GMP)	0,38±0,07	6,36±0,58	<,0001
Mononucleotídeo de Flavina (FMN)	0,51±0,02	1,52±0,09	<,0001
Flavina adenina dinucleotídeo (FAD)	0,53±0,02	0,27±0,02	<,0001
Inosina	116,01±6,68	41,29±1,13	<,0001
Uridina	0,66±0,05	1,92±0,06	<,0001
Xantina	0,09±0,01	0,53±0,03	<,0001
Hipoxantina	0,99±0,06	1,47±0,06	<,0001
Ácido úrico	0,19±0,02	0,12±0,003	0,0019
Colina	1,46±0,06	34,08±0,76	<,0001
Nicotinamida (vitamina B3)	2,99±0,12	6,06±0,24	<,0001

Fonte: Leite (2022)

Metabólitos detectados com PID foram normalizados pelos mesmos e seus dados convertidos em concentração em ng/mL. Metabólitos detectados sem PID foram normalizados com 2NMES (Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico) e seus dados estão em *area ratio*. Resultados em média ± SEM e valor de *P*. Valores de *P*<0,05, são apresentados em vermelho. Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

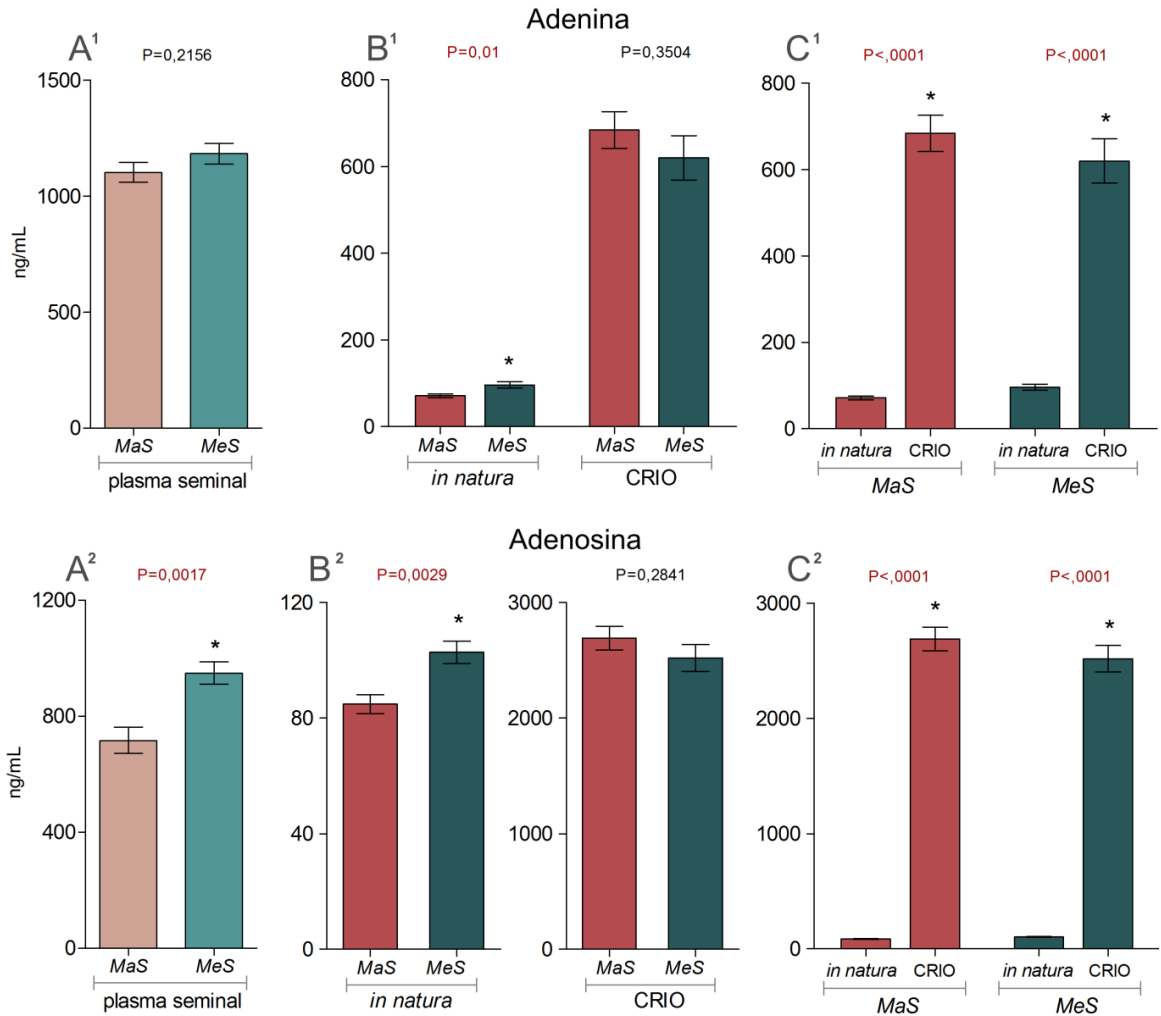
Tabela 66 - Resultados de metabólitos analisados em células espermáticas nos momentos pré e pós-criopreservação do grupo com menor suscetibilidade à criopreservação

Metabólito com PID (concentração em ng/mL)	Grupo Menor Suscetibilidade à Criopreservação		P
	Sêmen <i>in natura</i> (n=8)	Sêmen Criopreservado (n=8)	
	Média±SEM	Média±SEM	
Adenina	96,21±7,14	619,76±51,49	<,0001
Adenosina	102,77±3,83	2518,61±114,93	<,0001
Guanosina	499,86±15,84	278,93±28,22	<,0001
N-óxido de trimetilamina	166,87±6,68	14,75±0,66	<,0001
Metabólito sem PID ( <i>area ratio</i> )	Sêmen <i>in natura</i> (n=8)	Sêmen Criopreservado (n=8)	P
	Média±SEM	Média±SEM	
Monofosfato de Adenosina (AMP)	13,52±0,79	98,09±3,35	<,0001
AMP cíclico	1,06±0,03	2,22±0,13	<,0001
Monofosfato de Citidina (CMP)	0,28±0,02	0,06±0,01	<,0001
Monofosfato de Guanosina (GMP)	0,76±0,11	9,47±0,62	<,0001
Mononucleotídeo de Flavina (FMN)	0,64±0,03	1,60±0,08	<,0001
Flavina adenina dinucleotídeo (FAD)	0,17±0,01	0,40±0,03	<,0001
Inosina	266,95±5,37	22,24±0,67	<,0001
Uridina	1,34±0,04	2,25±0,10	<,0001
Xantina	0,12±0,01	0,81±0,03	<,0001
Hipoxantina	2,36±0,14	2,09±0,04	0,1061
Ácido úrico	0,35±0,02	0,15±0,01	<,0001
Colina	2,27±0,07	47,63±1,98	<,0001
Nicotinamida (vitamina B3)	8,93±0,33	3,91±0,20	<,0001

Fonte: Leite (2022)

Metabólitos detectados com PID foram normalizados pelos mesmos e seus dados convertidos em concentração em ng/mL. Metabólitos detectados sem PID foram normalizados com 2NMES (Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico) e seus dados estão em *area ratio*. Resultados em média ± SEM e valor de P. Valores de P<0,05, são apresentados em vermelho. Médias±SEM com valores significativamente maiores são apresentadas em azul.

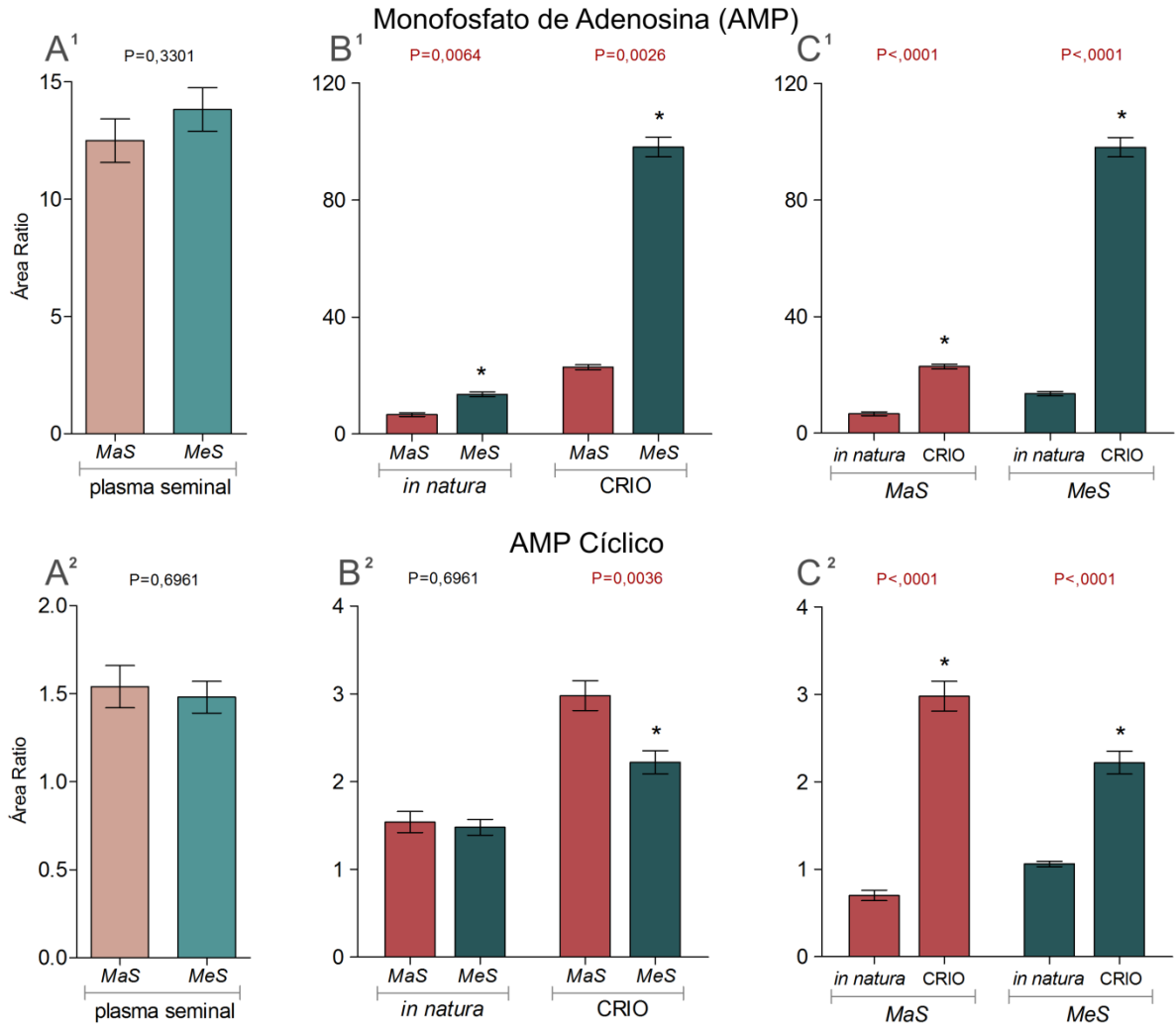
Figura 149 - Gráficos dos resultados das análises de adenina e adenosina em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de P são apresentados sobre as barras. MaS: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; MeS: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Os superescritos 1 e 2 acima das letras se referem, respectivamente, à adenina e adenosina; Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelamento (CRIO).

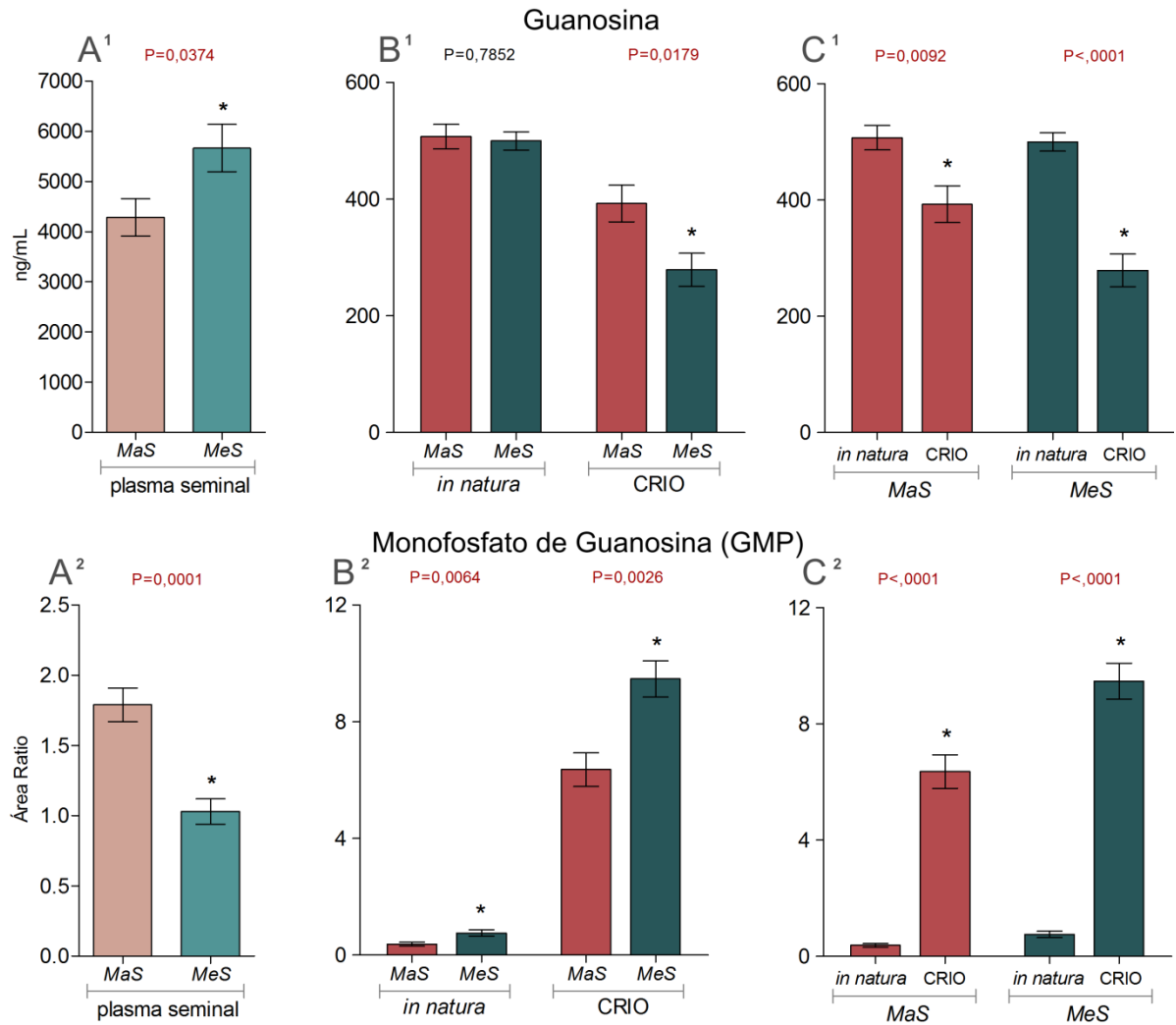
Figura 150 - Gráficos dos resultados das análises de monofosfato de adenosina (AMP) e AMP cíclico em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de P são apresentados sobre as barras. MaS: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; MeS: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Os superescritos 1 e 2 acima das letras se referem, respectivamente, à monofosfato de adenosina (AMP) e AMP cíclico; Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelação (CRIO).

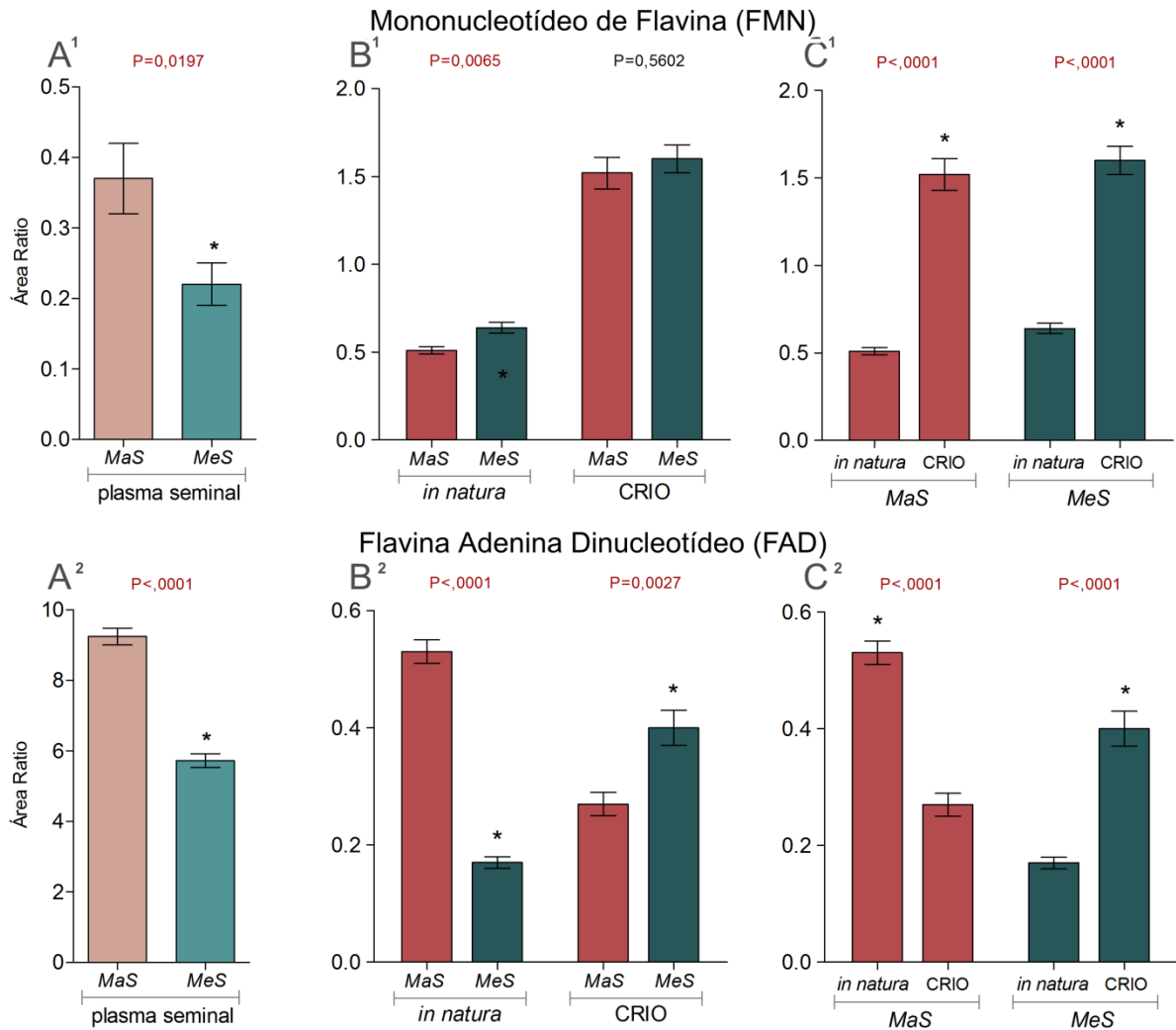
Figura 151 - Gráficos dos resultados das análises de guanosina e monofosfato de guanosina (GMP) em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de P são apresentados sobre as barras. MaS: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; MeS: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Os superescritos 1 e 2 acima das letras se referem, respectivamente, à guanosina e monofosfato de guanosina (GMP); Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelação (CRIO).

Figura 152 - Gráficos dos resultados das análises de mononucleotídeo de flavina (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD) em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

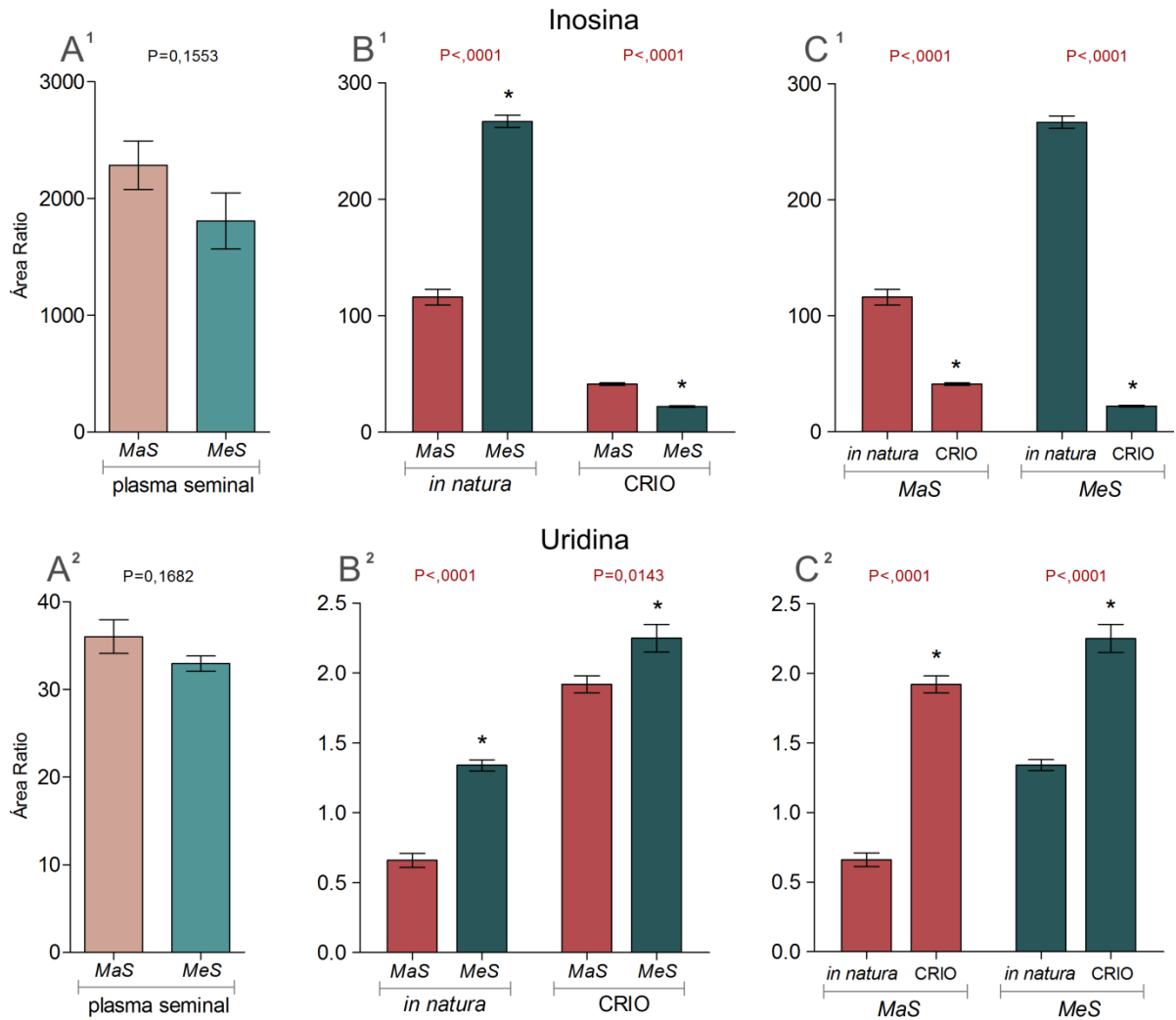


Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de *P* são apresentados sobre as barras. MaS: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; MeS: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Os superescritos 1 e 2 acima das letras se referem, respectivamente, à mononucleotídeo de flavina (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD); Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelação (CRIO).



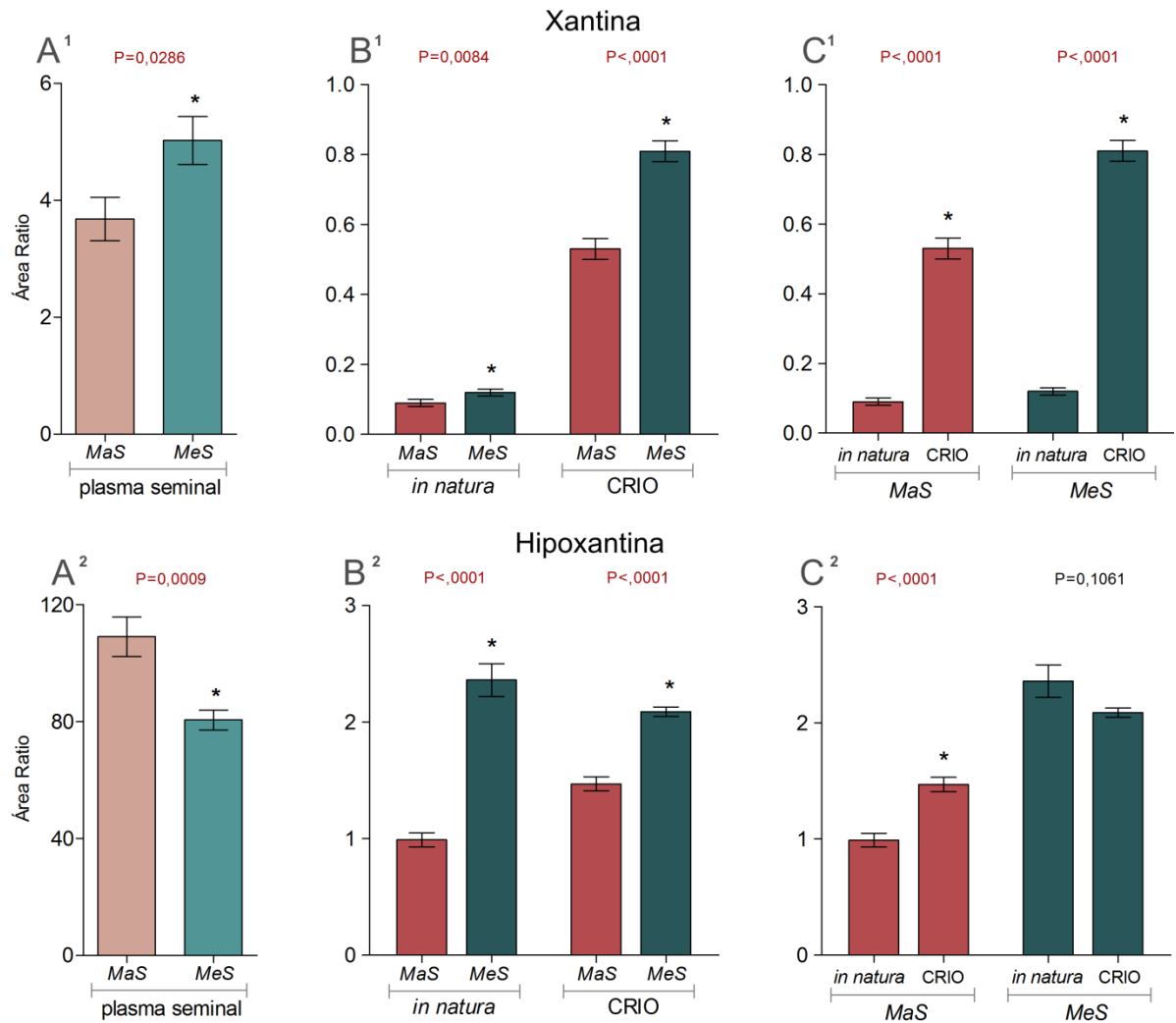
Figura 153 - Gráficos dos resultados das análises de inosina e uridina em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de P são apresentados sobre as barras. MaS: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; MeS: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Os superescritos 1 e 2 acima das letras se referem, respectivamente, à inosina e uridina; Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelação (CRIO).

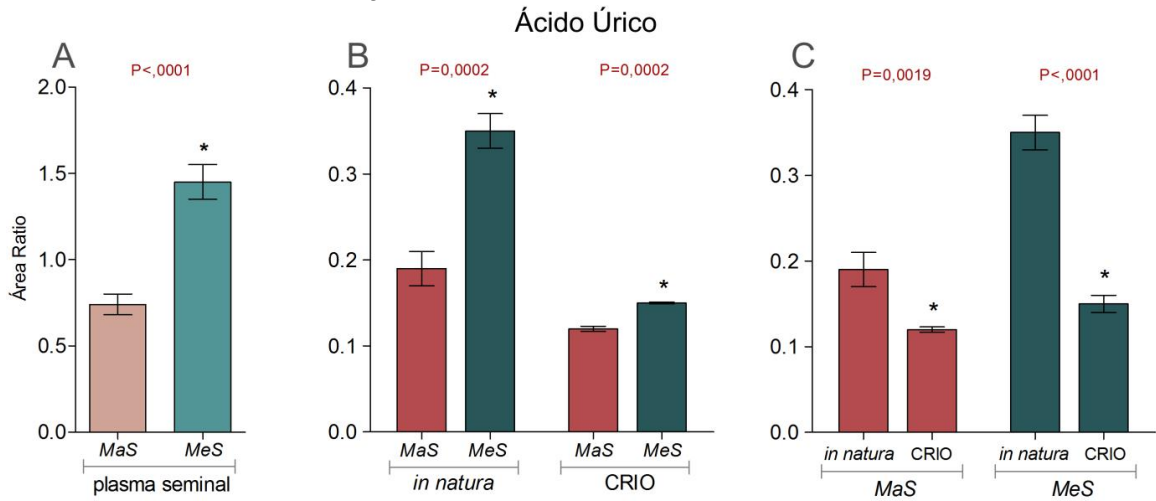
Figura 154 - Gráficos dos resultados das análises de xantina e hipoxantina em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de P são apresentados sobre as barras. MaS: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; MeS: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Os superescritos 1 e 2 acima das letras se referem, respectivamente, à xantina e hipoxantina; Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelação (CRIO).

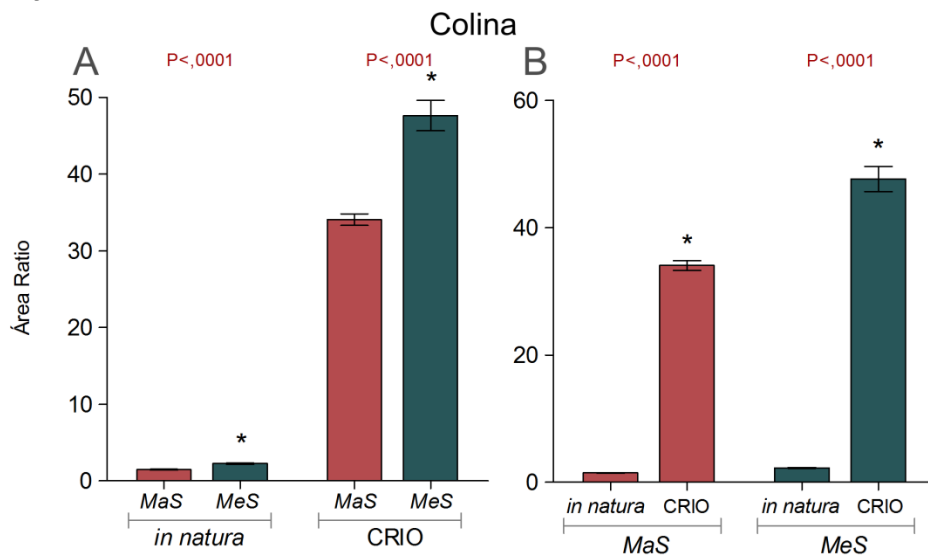
Figura 155 - Gráficos dos resultados das análises de ácido úrico em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de P são apresentados sobre as barras. MaS: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; MeS: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Em A: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em B: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelação (CRIO).

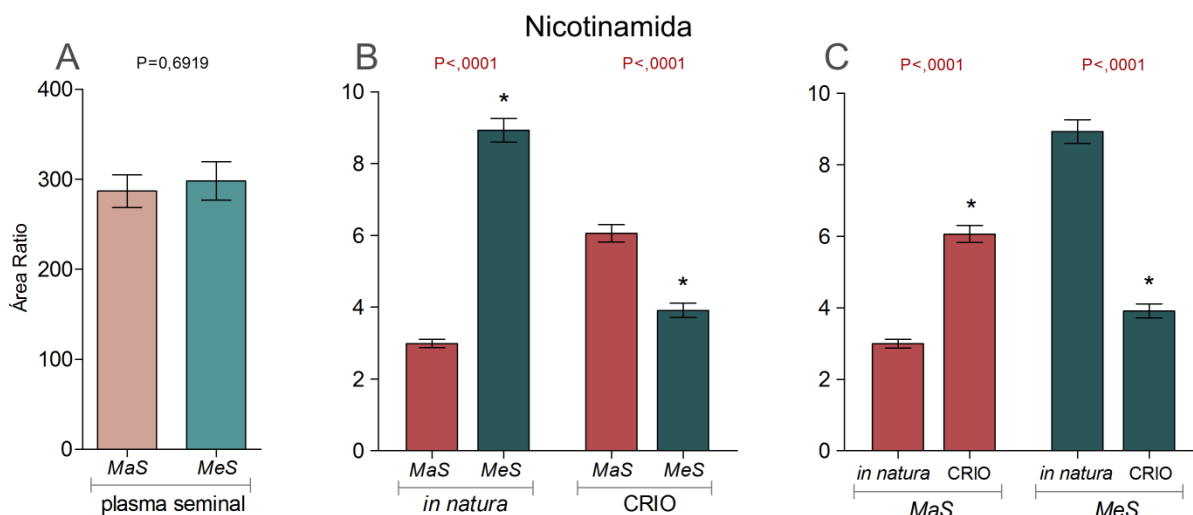
Figura 156 - Gráficos dos resultados das análises de colina em células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de P são apresentados sobre as barras. MaS: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; MeS: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Em A: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em B: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelação (CRIO).

Figura 157 - Gráficos dos resultados das análises de nicotinamida em plasma seminal e células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



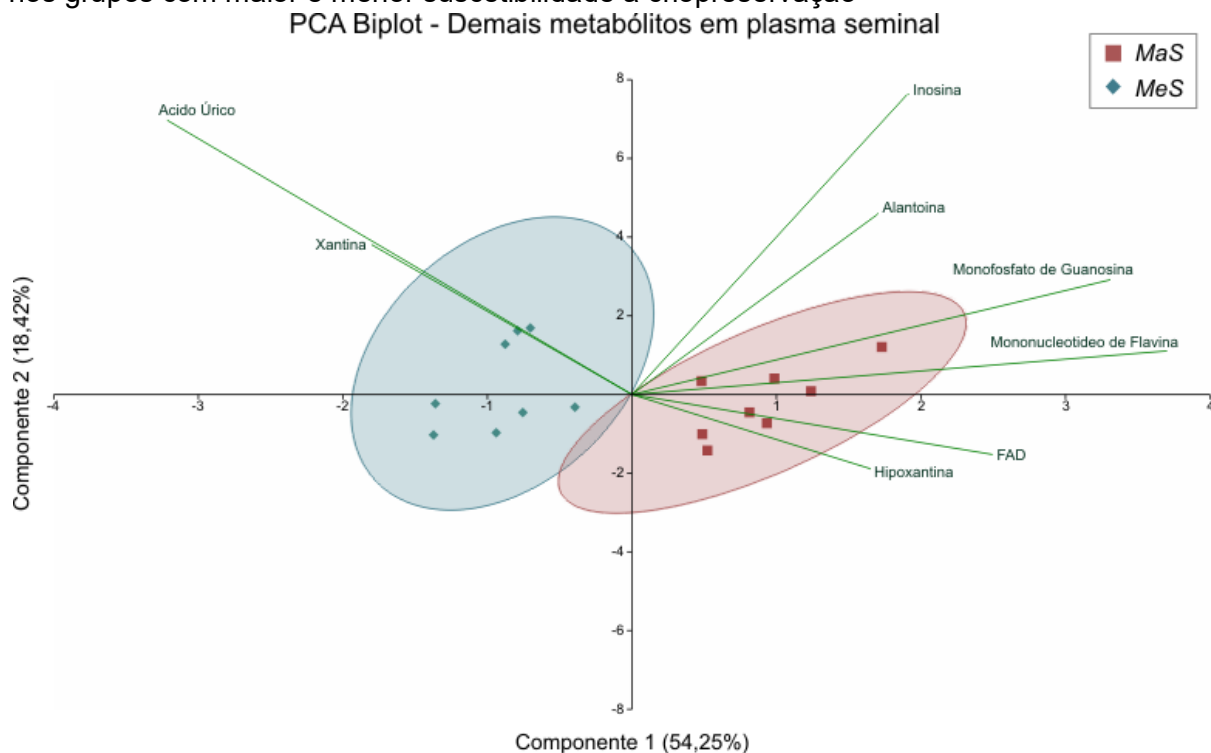
Fonte: Leite (2022)

Resultados apresentados em gráfico de barras com a média e erro padrão da média. Diferenças são marcadas por \* e os valores de *P* são apresentados sobre as barras. *MaS*: grupo com maior suscetibilidade à criopreservação; *MeS*: grupo com menor suscetibilidade à criopreservação. Em A: comparação dos grupos em plasma seminal; Em B: comparação dos grupos em amostras de células espermáticas de sêmen *in natura* e criopreservado (CRIO); Em C: comparação dentro de cada grupo nos momentos pré (*in natura*) e pós-congelação (CRIO).

#### 4.4.2.5.2 Resultados de PCA

Na análise em plasma seminal, os dados de nucleobases, nucleosídeos, nucleotídeos e demais metabólitos foram normalizados e submetidos à PCA, com a seleção de oito metabólitos pelos seus valores de *loadings* (Apêndice 6). Os metabólitos com maior contribuição na resposta de variância entre os grupos foram FMN, GMP, ácido úrico, FAD, inosina, xantina, hipoxantina e alantoína, sendo que este último metabólito foi detectado apenas em plasma seminal. O componente principal 1 foi responsável por 54,25% da variância e o componente principal 2, por 18,42%, totalizando 72,67%. O PCA *biplot* mostra separação entre *clusters* de amostras e uma pequena sobreposição das elipses de IC (Figura 158). O gráfico indica ainda que ácido úrico e xantina possuem maior influência sobre o grupo com menor suscetibilidade à criopreservação, enquanto FMN e GMP têm maior influência sobre o grupo com maior suscetibilidade (Figura 158).

Figura 158 - PCA em apresentação *biplot* de nucleobases e derivados em plasma seminal nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

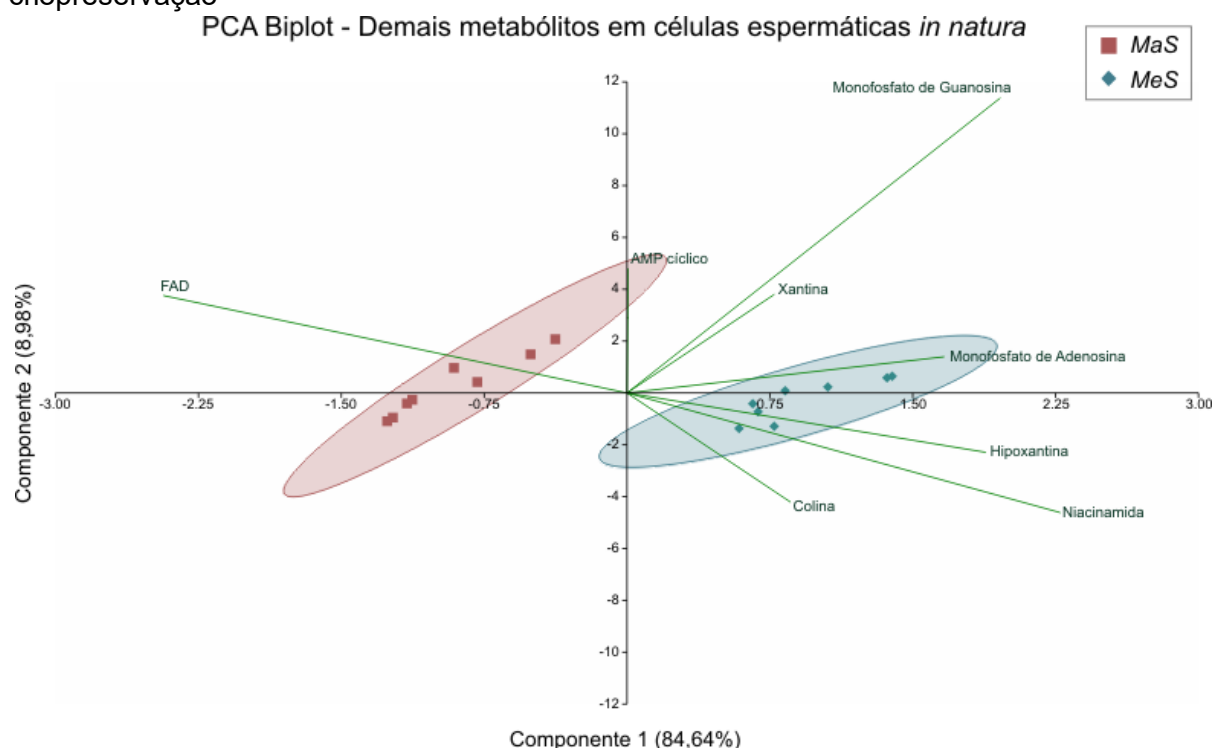


Fonte: Leite (2022)

Representação gráfica da separação entre os grupos com maior (*MaS*) e menor (*MeS*) suscetibilidade à criopreservação com os componentes principais 1 e 2, que respondem por uma variância total de 72,67%. A variância explicada pelos componentes é apresentada entre parênteses. Os *clusters* das amostras dos grupos são indicados conforme a legenda e circundados por elipses de IC. As linhas e texto em verde indicam as variáveis selecionadas e a importância das mesmas (escala *eigenvalue*) na variância e separação dos grupos.

Nas células espermáticas de sêmen *in natura* também foram selecionados oito metabólitos. Os maiores valores de *loadings* foram observados em FAD, nicotinamida, GMP, hipoxantina, AMP, AMP cíclico, colina e xantina (Apêndice 6). Os componentes principais 1 e 2 responderam por 84,64% e 8,98% da variância, respectivamente, com um total de 93,62%. Há separação clara entre os *clusters* de amostras dos grupos e elipses de IC (Figura 159). Entre os metabólitos selecionados, nicotinamida, GMP, hipoxantina e AMP possuem maior influência sobre o grupo com menor suscetibilidade à criopreservação, enquanto o FAD possui mais efeito sobre o grupo com maior suscetibilidade (Figura 159).

Figura 159 - PCA em apresentação *biplot* de nucleobases e derivados em células espermáticas de sêmen *in natura* nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

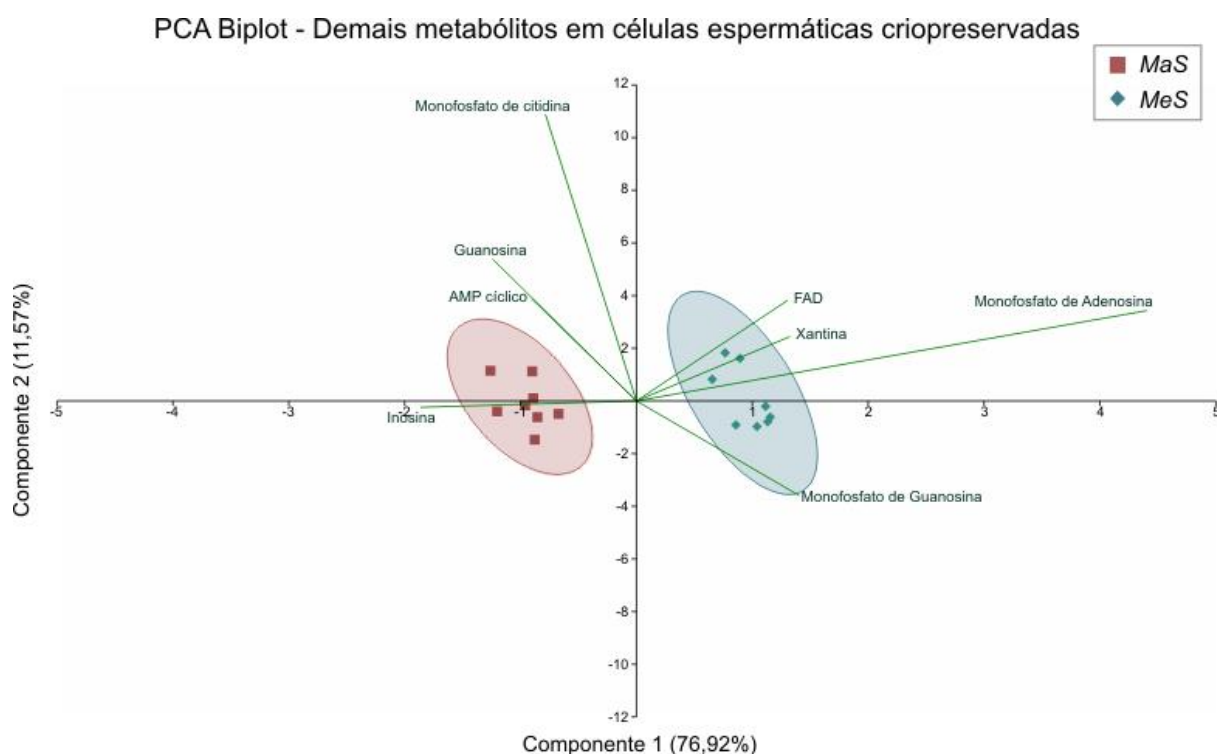


Fonte: Leite (2022)

Representação gráfica da separação entre os grupos com maior (*MaS*) e menor (*MeS*) suscetibilidade à criopreservação com os componentes principais 1 e 2, que respondem por uma variância total de 93,62%. A variância explicada pelos componentes é apresentada entre parênteses. Os *clusters* das amostras dos grupos são indicados conforme a legenda e circundados por elipses de IC. As linhas e texto em verde indicam as variáveis selecionadas e a importância das mesmas (escala *eigenvalue*) na variância e separação dos grupos.

Na PCA de células espermáticas de sêmen criopreservado, novamente oito metabólitos foram selecionados pelos seus valores de *loadings* (Apêndice 6): AMP, inosina, GMP, xantina, FAD, guanósina, AMP cíclico e CMP. A resposta da variância dos componentes 1 e 2 foi de 79,92% e 11,57%, respectivamente, totalizando 88,49%. Houve separação dos *clusters* de amostras e elipses de IC (Figura 160). O PCA *biplot* mostra que AMP, GMP e xantina possuem maior importância sobre o grupo *MeS*, enquanto inosina e guanósina têm maior influência sobre o grupo *MaS* (Figura 160).

Figura 160 - PCA em apresentação *biplot* de nucleobases e derivados em células espermáticas de sêmen criopreservado nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação



Fonte: Leite (2022)

Representação gráfica da separação entre os grupos com maior (*MaS*) e menor (*MeS*) suscetibilidade à criopreservação com os componentes principais 1 e 2, que respondem por uma variância total de 88,49%. A variância explicada pelos componentes é apresentada entre parênteses. Os *clusters* das amostras dos grupos são indicados conforme a legenda e circundados por elipses de IC. As linhas e texto em verde indicam as variáveis selecionadas e a importância das mesmas (escala *eigenvalue*) na variância e separação dos grupos.

#### 4.4.3 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO DE DADOS FUNCIONAIS E METABÓLICOS

As análises de correlação foram feitas com dados não transformados pelo teste de Spearman, com classificação por grupo e ranqueamento dos resultados. Os resultados abaixo são apresentados por grupo com os dados obtidos nas análises de amostras de células criopreservadas. A correlação foi feita com variáveis funcionais com maior importância na diferença observada entre os grupos e metabólitos selecionados pelos resultados de PCA em cada classe. Como foram observadas poucas correlações, os resultados são apresentados pelas diferentes classes metabólicas. Os quadros de correlação estão disponíveis no Apêndice 7.

Na classe de lipídios, no grupo com menor suscetibilidade à criopreservação (*MeS*) houve correlação positiva entre o ácido docosahexaenóico (DHA) com motilidade total ( $r=0,738$ ,  $P=0,0366$ ), motilidade progressiva ( $r=0,905$ ,  $P=0,002$ ) e

integridade de membrana acrossomal ( $r=0,952$ ,  $P=0,0003$ ), e correlação inversa com PMM alto ( $r=-0,905$ ,  $P=0,002$ ) e presença de EROs ( $r=-0,692$ ,  $P=0,048$ ). Entre as esfingomielinas (SM) o grupo *MeS* apresentou correlação inversa de SM(d18:1/16:1) com atividade mitocondrial baixa ( $r=-0,826$ ,  $P=0,0115$ ), e inversa de SM(d18:1/24:0) com amplitude do movimento lateral da cabeça ( $r=-0,834$ ,  $P=0,0103$ ). No grupo houve ainda correlação com fosfatidilcolinas (PC), como correlação inversa de PC(38:6) com PMM médio ( $r=-0,809$ ,  $P=0,0149$ ) e de PC(16:1(9Z)/16:1(9Z)) com fragmentação de DNA ( $r=-0,732$ ,  $P=0,039$ ).

Quanto ao grupo com maior suscetibilidade à criopreservação (*MaS*), entre os lipídios, foi observada correlação positiva entre a esfingosina (16:0) e espermatozoides estáticos ( $r=0,784$ ,  $P=0,026$ ). Correlação positiva entre a esfingomielina (d18:1/24:0) e PMM baixo ( $r=0,816$ ,  $P=0,0084$ ) e inversa com PMM alto ( $r=-0,645$ ,  $P=0,0124$ ), motilidade progressiva ( $r=-0,81$ ,  $P=0,0149$ ) e integridade de membranas plasmática ( $r=-0,738$ ,  $P=0,0366$ ) e acrossomal ( $r=-0,786$ ,  $P=0,0208$ ). Na classe de fosfatidilcolinas houve correlação positiva entre PC(18:0/22:6) e atividade mitocondrial baixa ( $r=0,766$ ,  $P=0,0267$ ) e amplitude do movimento lateral da cabeça ( $r=0,755$ ,  $P=0,0221$ ), e inversa com linearidade ( $r=-0,843$ ,  $P=0,0085$ ). Por fim, foram observadas correlações com lisofosfatidilcolinas (LPC), com correlação positiva de LPC(16:0/0:0) com PMM baixo ( $r=0,857$ ,  $P=0,0065$ ) e inversa com PMM alto ( $r=-0,863$ ,  $P=0,0087$ ), e correlação inversa de LPC(18:1) com motilidade progressiva ( $r=-0,719$ ,  $P=0,0446$ ) e integridade de membrana plasmática ( $r=-0,762$ ,  $P=0,028$ ).

Entre as carnitinas, no grupo *MeS* houve correlação positiva entre propionil-L-carnitina com PMM médio ( $r=0,801$ ,  $P=0,0135$ ) e alto ( $r=0,714$ ,  $P=0,0465$ ) e da estearoil-L-carnitina com PMM médio ( $r=0,733$ ,  $P=0,019$ ), enquanto L-carnitina apresentou correlação inversa com atividade mitocondrial alta ( $r=-0,766$ ,  $P=0,0265$ ). Quanto ao grupo *MaS*, não foram observadas correlações entre carnitina e atividade mitocondrial, no entanto houve correlação positiva entre palmitoil-L-carnitina e motilidade progressiva ( $r=0,714$ ,  $P=0,0335$ ), e inversa entre estearoil-L-carnitina e linearidade ( $r=-0,711$ ,  $P=0,0481$ ) e entre propionil-L-carnitina e espermatozoides estáticos ( $r=-0,910$ ,  $P=0,0017$ ).

Nos peptídeos detectados, o grupo *MeS* apresentou correlação inversa entre glutathiona e suscetibilidade à fragmentação de DNA ( $r=-0,781$ ,  $P=0,0222$ ). No grupo *MAS* houve correlação positiva de glutathiona oxidada e PMM baixo ( $r=0,842$ ,  $P=0,0138$ ) e inversa da mesma com PMM médio e alto ( $r=-0,718$ ,  $P=0,0342$  e  $r=-$



0,813,  $P=0,0138$ , respectivamente). Entre os aminoácidos e derivados, no grupo *MeS* houve correlação positiva de glutamina com alta atividade mitocondrial ( $r=0,874$ ,  $P=0,0045$ ), índice de atividade mitocondrial ( $r=0,810$ ,  $P=0,0149$ ) e integridade de membrana plasmática ( $r=0,714$ ,  $P=0,0427$ ), e correlação inversa deste metabólito com espermatozoides estáticos ( $r=-0,831$ ,  $P=0,0105$ ). Neste grupo foi observada ainda correlação inversa de creatina com índice de atividade mitocondrial ( $r=-0,762$ ,  $P=0,028$ ) e positiva entre fenilalanina e integridade de membrana plasmática ( $r=0,834$ ,  $P=0,011$ ). No grupo *MaS*, houve correlação positiva entre triptofano e atividade mitocondrial média ( $r=0,663$ ,  $P=0,04733$ ) e correlação inversa entre triptofano, tirosina e citrulina e presença de EROs ( $r=0,711$ ,  $P=0,0451$ ,  $r=0,807$ ,  $P=0,0159$  e  $r=0,703$ ,  $P=0,0446$ , respectivamente). Foram observadas no grupo correlações inversas entre alanina e integridade de membrana plasmática ( $r=-0,857$ ,  $P=0,0065$ ), de valina e metionina com suscetibilidade à fragmentação de DNA ( $r=-0,79$ ,  $P=0,0195$  e  $r=-0,719$ ,  $P=0,0321$ , respectivamente) e de metionina com PMM alto ( $r=-0,857$ ,  $P=0,0058$ ). Houve ainda correlação inversa de glutamina com suscetibilidade à peroxidação lipídica ( $r=-0,738$ ,  $P=0,0367$ ).

Na classe de ácidos orgânicos, foi observado no grupo *MeS* correlação positiva entre ácido cítrico e atividade mitocondrial alta ( $r=0,922$ ,  $P=0,0011$ ) e média ( $r=0,837$ ,  $P=0,0096$ ), bem como correlação positiva do ácido láctico com motilidade total ( $r=0,748$ ,  $P=0,0377$ ) e progressiva ( $r=0,723$ ,  $P=0,0324$ ), integridade de membrana acrossomal ( $r=0,704$ ,  $P=0,0431$ ), e inversa com espermatozoides estáticos ( $r=-0,916$ ,  $P=0,0014$ ). Houve correlação inversa entre o ácido isocítrico e espermatozoides estáticos ( $r=-0,855$ ,  $P=0,0068$ ), além de correlação inversa deste com suscetibilidade à peroxidação lipídica ( $r=-0,811$ ,  $P=0,0169$ ). O grupo *MaS*, em contrapartida apresentou correlações apenas com o ácido  $\alpha$ -cetoglutárico. Houve correção positiva entre este metabólito e PMM médio ( $r=0,75$ ,  $P=0,0322$ ) e linearidade ( $r=0,818$ ,  $P=0,0244$ ), e inversa com atividade mitocondrial baixa ( $r=-0,753$ ,  $P=0,049$ ) e PMM baixo ( $r=-0,786$ ,  $P=0,0362$ ).

Por fim, na classe de nucleobases, nucleosídeos e derivados, foi observado no grupo *MeS* correlação positiva entre AMP e motilidade progressiva ( $r=0,834$ ,  $P=0,0102$ ) e integridade de membrana acrossomal ( $r=0,736$ ,  $P=0,0366$ ) e inversa entre AMP cíclico e linearidade ( $r=-0,808$ ,  $P=0,0149$ ). Xantina e FAD, por outro lado, apresentaram correlação positiva com linearidade ( $r=0,717$ ,  $P=0,0455$  e  $r=0,762$ ,  $P=0,028$ , respectivamente). Quanto ao grupo *MaS*, houve correlação inversa entre

nicotinamida e motilidade progressiva ( $r=-0,970$ ,  $P<,0001$ ), integridade de membranas plasmática e acrossomal ( $r=-0,786$ ,  $P=0,0208$  e  $r=-0,881$ ,  $P=0,0039$ , respectivamente), bem como entre inosina e PMM alto ( $r=-0,905$ ,  $P=0,002$ ) e médio ( $r=-0,762$ ,  $P=0,028$ ).

#### 4.4.4 DISCUSSÃO

Por muitos anos o setor de pecuária no mundo todo apresenta ganhos genéticos e, conseqüentemente, produtivos, pela aplicação de biotécnicas como a IA e IATF, as quais dependem fundamentalmente do uso do sêmen criopreservado. A criopreservação de células espermáticas permite, por exemplo, o uso de touros com alto mérito genético mas fisicamente incapacitados, a distribuição e transporte de sêmen das mais diversas raças e origens, facilitando a diversidade e melhoramento genético, além de reduzir a transmissão de doenças e o custo da manutenção de touros para a monta natural nas propriedades. No entanto, apesar de intensas pesquisas, o processo de criopreservação ainda é um desafio em várias espécies devido à redução da qualidade seminal e viabilidade dos espermatozoides após a descongelação do sêmen (O'CONNELL, MCCLURE e LEWIS, 2002; MOCÉ, BLANCH, *et al.*, 2010; LAYEK, MOHANTY, *et al.*, 2016; UGUR, SABER ABDELRAHMAN, *et al.*, 2019).

Neste estudo, as análises funcionais realizadas em sêmen criopreservado com maior e menor suscetibilidade ao processo de criopreservação demonstraram resultados que corroboram os estudos citados acima, com a redução da viabilidade espermática pós-congelação. Entretanto, as análises realizadas quanto ao perfil metabólico permitem uma visão mais ampla dos efeitos dos processos de congelação e descongelação, considerando-se que estudos anteriores não fizeram uma avaliação conjunta dos metabólitos presentes no plasma seminal, células pré e pós congelação nos mesmos ejaculados (CRAIG, BRUSH, *et al.*, 2019; EVANS, DINH, *et al.*, 2020; LAZZARINO, LISTORTI, *et al.*, 2018; LONGOBARDI, KOSIOR, *et al.*, 2020; MEMILI, MOURA e KAYA, 2020; VELHO, MENEZES, *et al.*, 2018; ZHANG, LIANG, *et al.*, 2021). O plasma seminal bovino é composto de secreções oriundas do testículo, epidídimo e glândulas sexuais acessórias, contendo proteínas e metabólitos como lipídios, aminoácidos, monossacarídeos, ácidos orgânicos, hormônios esteroides, nucleosídeos e derivados, entre outros (SANGEETA, ARANGASAMY, *et al.*, 2015; UGUR, SABER ABDELRAHMAN, *et al.*, 2019). Estes

são importantes para suprir necessidades dos espermatozoides *in natura*, antes que os mesmos passem pelos processos de diluição, resfriamento e congelação (EGEA, PUCHALT, *et al.*, 2014; UGUR, DINH, *et al.*, 2020). Vale destacar ainda que muitos estudos consideram os efeitos de criopreservação e redução da fertilidade conjuntamente (WATSON, 2000; BAILEY, BILODEAU e CORMIER, 2000; LAYEK, MOHANTY, *et al.*, 2016; LONGOBARDI, KOSIOR, *et al.*, 2020; EVANS, DINH, *et al.*, 2020), enquanto as amostras utilizadas no presente estudo são de touros com boa taxa de fertilidade. Houve ainda o cuidado da distribuição das amostras, oriundas de touros *Bos taurus*, *Bos indicus* e raças resultantes de cruzamento industrial, todos sob o mesmo manejo, de forma homogênea entre os grupos.

A análise dos perfis de lipídios e demais metabólitos de plasma seminal, células espermáticas *in natura* e criopreservadas permitiu uma melhor avaliação do *status* metabólico dos espermatozoides pós-criopreservação, com aumento ou redução de metabólitos detectados em diferentes classes. Além disso, os resultados funcionais obtidos no primeiro experimento demonstraram que a seleção dos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação foi efetiva, o que é fundamental para a correlação dos mesmos com o *status* metabólico dos espermatozoides criopreservados. Devido ao impacto dos processos de congelação e descongelação em diferentes estruturas espermáticas, bem como pelos resultados observados nas diferentes amostras biológicas, a discussão foi dividida em perfil de lipídios e carnitinas e perfil de aminoácidos, ácidos orgânicos, nucleosídeos e derivados.

### **Perfil de lipídios e carnitinas**

Vários estudos realizados durante muitos anos buscam melhorar o processo de criopreservação para ampliar a quantidade e qualidade de células espermáticas viáveis após o mesmo (MOCÉ, BLANCH, *et al.*, 2010; CELEGHINI, DE ARRUDA, *et al.*, 2008; LAYEK, MOHANTY, *et al.*, 2016; LONGOBARDI, KOSIOR, *et al.*, 2020; EVANS, DINH, *et al.*, 2020). Apesar de ser um problema multifatorial e resultar em danos a todas as estruturas espermáticas, muitas vezes em reações em cadeia (BAILEY, MORRIE e CORMIER, 2003; NICHI, BOLS, *et al.*, 2006; BÜYÜKLEBLEBICI, TUNCER, *et al.*, 2014), a criopreservação afeta principalmente um órgão essencial para que a fertilização possa ocorrer, a membrana plasmática. Desta forma, a redução do impacto negativo da criopreservação, principalmente

quanto à integridade da membrana plasmática, exige uma maior compreensão dos eventos moleculares alterados, o que pode ser alcançado com a avaliação do *status* metabólico dos espermatozoides antes e após este processo (O'CONNELL, MCCLURE e LEWIS, 2002; MOCÉ, BLANCH, *et al.*, 2010; EVANS, DINH, *et al.*, 2020).

Os resultados aqui observados mostram diferenças e mudanças importantes na quantidade de lipídios nas diferentes amostras biológicas entre os grupos estudados. Apesar das análises no plasma seminal mostrarem diferenças pequenas entre os grupos, com o grupo com menor suscetibilidade à criopreservação (*MeS*) apresentando maior concentração em apenas cinco dos lipídios detectados, as diferenças aumentaram na comparação das amostras de células espermáticas *in natura*, com maior presença dos lipídios no grupo *MeS*. Entre estes, vale destacar a maior concentração de colesterol e DHA. Em contrapartida, o grupo com maior suscetibilidade à criopreservação (*MaS*) apresentou somente maior concentração da esfingosina (d16:0) e do lisofosfolípido (17:1(10Z)/0:0). Entretanto, este perfil apresentou uma grande mudança na comparação entre os grupos em espermatozoides pós-criopreservação. A análise neste momento demonstrou que o grupo *MeS* manteve apenas maior concentração de ácido docosahexaenóico (DHA) e passou a ter maior concentração da esfingosina (d16:0), com redução inclusive na sua concentração de colesterol. Por outro lado, o grupo *MaS* passou a ter maior concentração de todos os demais lipídios detectados, com exceção apenas para o liso-PAF, para o qual não houve diferença entre os grupos.

As diferenças observadas nos perfis lipídicos nas diferentes amostras biológicas chamam a atenção, inicialmente, ao fato do grupo *MeS* possuir maior concentração de colesterol nas células *in natura* e redução desta nas células criopreservadas. A diferença entre os grupos no que se refere ao colesterol é observada ainda na comparação dos momentos pré e pós-criopreservação dentro de cada grupo, com uma redução na concentração no grupo *MeS* e ausência de diferença no grupo *MaS*. Entre a classe de lipídios neutros identificados na membrana plasmática de espermatozoides, o colesterol é o mais abundante e com funções essenciais, como por exemplo a manutenção da estrutura da membrana, (PARKS e LYNCH, 1992; KEBER, ROZMAN e HORVAT, 2013; LEAHY e GADELLA, 2015; SHAN, XU, *et al.*, 2021), provendo estabilidade inclusive em baixas temperaturas por sua influência na transição de fase dos demais lipídios (AMORIM,

GRAHAM, *et al.*, 2009; MOCÉ, BLANCH, *et al.*, 2010). Portanto, o resultado observado sugere que a maior presença de colesterol nas amostras de espermatozoides *in natura* no grupo com menor suscetibilidade à criopreservação foi benéfica para a manutenção da integridade de membrana durante a criopreservação, mesmo com a redução da mesma no processo. Esta observação é corroborada não apenas pelos resultados funcionais obtidos, mas por estudos realizados em diferentes espécies, incluindo bovinos, que demonstram que a adição de colesterol antes da criopreservação, por meio do tratamento com ciclodextrinas pré-carregadas com este esterol, melhora a qualidade e viabilidade dos espermatozoides no momento pós-descongelamento (BLANCH, TOMAS, *et al.*, 2008; AMORIM, GRAHAM, *et al.*, 2009; MOCÉ, BLANCH, *et al.*, 2010; LONE, 2018). Estes estudos consideram o papel do colesterol não apenas na manutenção da estabilidade da membrana plasmática em baixas temperaturas, mas ainda a sua ação na modulação de fluidez, permeabilidade e manutenção de microdomínios por sua interação com as diferentes classes lipídicas e proteínas (AM-IN, KIRKWOOD, *et al.*, 2011; LONE, 2018; SHAN, XU, *et al.*, 2021).

A menor concentração de colesterol nos espermatozoides *in natura* no grupo com maior suscetibilidade à criopreservação é corroborada pelos resultados observados nos estudos acima, bem como pela menor porcentagem de células com membrana plasmática íntegra observada nas análises funcionais. Em relação aos danos de membrana, vale destacar novamente o fato de que o colesterol contribui para uma maior estabilidade de membrana na fase de transição dos estados líquido, gel e de cristais de gelo dos fosfolipídios durante o resfriamento e congelamento. Os diferentes lipídios da membrana passam por esta transição em temperaturas distintas e a menor presença de colesterol pode fazer com que muitas interações lipídio-proteína sejam perdidas, causando agregação de proteínas em áreas mais líquidas, tornando a membrana instável e com perda de funcionalidade (MOCÉ, BLANCH, *et al.*, 2010; LAYEK, MOHANTY, *et al.*, 2016; SHAN, XU, *et al.*, 2021). Há ainda a possibilidade de que os danos de membrana plasmática observados no grupo com maior suscetibilidade à criopreservação, somados à maior presença de EROs e possível peroxidação lipídica (MANDAL, BADIYAKAR e CHAKRABARTY, 2014; KUMAR, PRASAD, *et al.*, 2019), possam responder também pela maior presença de colesterol observada nos espermatozoides pós-criopreservação neste grupo.

Outra diferença que merece destaque nas análises das diferentes amostras é a observada no ácido docosahexaenóico (DHA), ácido graxo poliinsaturado (PUFA) abundante nas células espermáticas de bovinos (MARTÍNEZ-SOTO, LANDERAS e GADEA, 2013; EVANS, DINH, *et al.*, 2020). Apesar de não ter havido diferença na concentração do mesmo no plasma seminal, as células espermáticas do grupo com menor suscetibilidade à criopreservação apresentaram maior quantidade de DHA tanto nas amostras *in natura* quanto nas criopreservadas, com a importância do DHA sobre o grupo MeS sendo evidenciada ainda nas análises de componente principal. Nas células criopreservadas, o grupo apresentou ainda correlação positiva de DHA com motilidade, motilidade progressiva e integridade de membrana acrossomal, e correlação inversa com presença de EROs, observações corroboradas pelos resultados funcionais. Estudos demonstram que, como o colesterol, PUFAs conferem proteção aos espermatozoides durante o processo de criopreservação, além de sua maior presença estar associada à maior fluidez de membrana, motilidade e viabilidade espermática, benefícios que levam, inclusive, à adição de DHA em diluidores (WASSALL e STILLWELL, 2009; NASIRI, TOWHIDI e ZEINOALDINI, 2012; MANDAL, BADIYAKAR e CHAKRABARTY, 2014; LOSANO, ANGRIMANI, *et al.*, 2018).

Na classe de esfingosinas, não obstante a detecção de apenas um lipídio (Sph(d16:0)), a variação de concentração nas diferentes amostras biológicas e a redução de sua concentração durante o processo de criopreservação nos dois grupos merecem atenção. Os resultados levantam a hipótese de que a menor concentração pós-criopreservação pode estar relacionada ao seu papel como precursora de esfingosina-1-fosfato (S1P). Sintetizada a partir da ação da esfingosina quinase sobre esfingosinas, a S1P regula uma série de processos celulares e possui ação como antagonista de níveis elevados de ceramida, inibindo desta forma a apoptose celular (GUO, OU, *et al.*, 2014; SINGH, ESCOBAR, *et al.*, 2019; LEE, CHO, *et al.*, 2021). Estudos sobre o papel das esfingosinas e da S1P na inibição de processos de apoptose em espermatozoides são escassos e não foi realizada a detecção de metabólitos intermediários no presente estudo para verificar esta hipótese. Entretanto, a maior presença de esfingosina em células *in natura* e menor presença em amostras pós-criopreservação no grupo MaS, bem como a alta correlação positiva observada entre Sph(d16:0) e células estáticas, sugere a necessidade de maiores estudos sobre esfingosinas, ação da esfingosina quinase e

produção de S1P na redução de processos de apoptose durante a criopreservação. Vale notar, que as esfingosinas constituem ainda a base primária de esfingolipídios, como as esfingomielinas (GUO, OU, *et al.*, 2014; SHAN, XU, *et al.*, 2021), as quais foram mais abundantes nas células criopreservadas do grupo *MaS*, o que justificaria, de forma mais direta, a redução na concentração de esfingosinas.

As diferentes classes de fosfolipídios são essenciais na composição lipídica e na arquitetura heterogênea das membranas plasmática e acrossomal, sendo fundamentais para a viabilidade espermática (LENZI, PICARDO, *et al.*, 1996; GADELLA, 2008; MANDAL, BADIYAKAR e CHAKRABARTY, 2014) Nas diferentes classes de fosfolipídios neste estudo foram detectadas as classes de esfingomielinas (SM), fosfatidilcolinas (PC) e lisofosfatidilcolinas (LPC). Entre as esfingomielinas, houve diferença em apenas duas, com maior presença no grupo *MeS* na análise de plasma seminal. Nas células espermáticas *in natura*, apenas uma delas manteve maior concentração no mesmo grupo, a palmitoil esfingomielina (d18:1/16:1). Entretanto, conforme mencionado anteriormente, na comparação entre células criopreservadas, o grupo *MaS* passou a ter maior concentração de todas as esfingomielinas detectadas. O mesmo foi observado quanto às fosfatidilcolinas, com maior presença de algumas representantes desta classe no plasma seminal e células *in natura* no grupo *MeS* e maior abundância de todas as PC detectadas nas células criopreservadas do grupo *MaS*. Apesar da uma redução, de forma geral, na concentração dos fosfolipídios na comparação dos momentos pré e pós-criopreservação nos dois grupos, os resultados chamam a atenção quanto a maior concentração de SM e PC nas amostras de células criopreservadas do grupo *MaS*. Estas duas classes lipídicas possuem papel importante na preservação da estrutura dinâmica da membrana plasmática e as esfingomielinas atuam ainda no controle da homeostase do colesterol, por sua grande afinidade com o mesmo (CROSS, 2000; MULLER, MULLER, *et al.*, 2008; CRAIG, BRUSH, *et al.*, 2019; AHUMADA-GUTIERREZ, PEÑALVA, *et al.*, 2019). Portanto, é possível que o aumento de SM e PC pós-criopreservação esteja relacionado com a instabilidade e quebra da integridade da membrana plasmática observada no grupo nas análises funcionais. Conforme já mencionado, a diversidade de classes lipídicas presentes na membrana faz com que a transição de fase ocorra em uma faixa de temperatura relativamente ampla (MOCÉ, BLANCH, *et al.*, 2010; SHAN, XU, *et al.*, 2021). O fato deste grupo ter apresentado menor presença de colesterol e DHA nas amostras de células *in*

*natura*, metabólitos que contribuem para a manutenção da estabilidade da membrana durante o processo de criopreservação, pode ser considerado uma causa de maior instabilidade durante a fase de transição. No que se refere à maior presença de SM, os resultados demonstram ainda a correlação inversa da SM(d18:1/24:0) com integridade de membranas plasmática e acrossomal, bem como com motilidade progressiva nas células criopreservadas do grupo *MaS*.

Na classe de lisofosfatidilcolinas, foram observadas poucas diferenças na comparação dos grupos em plasma seminal e células *in natura*. Apesar dos dois grupos apresentarem um aumento na concentração de LPC entre os momentos pré e pós-criopreservação, o grupo *MaS* apresentou, novamente, maior presença desta classe nas células criopreservadas em comparação com o grupo *MeS*. Formadas a partir da hidrólise de fosfatidilcolinas, LPC são importantes moléculas de sinalização relacionadas à alterações na cinética espermática e aos processos de hiperativação, capacitação e reação acrossomal (BAILEY, BILODEAU e CORMIER, 2000; MURASE, EL-KON, *et al.*, 2010; LONGOBARDI, KOSIOR, *et al.*, 2020). A presença de LPC é importante para manutenção de uma série de funções fisiológicas dos espermatozoides, no entanto, há estudos que demonstram que o equilíbrio entre a formação e o catabolismo das mesmas deve ser mantido para evitar a instabilidade celular e comprometimento da viabilidade espermática (ODEH, DASCANIO, *et al.*, 2003; WU, GAO, *et al.*, 2020). Estes estudos corroboram a possibilidade de que maior presença de LPC nas células criopreservadas do grupo *MaS* pode ser um fator adicional para a instabilidade celular e redução na integridade da membrana plasmática. De fato, a análise de correlação no grupo demonstra uma correlação inversa entre LPC(18:1) e integridade de membrana plasmática e motilidade progressiva.

A maior presença de fosfolípidios nas células criopreservadas do grupo com maior suscetibilidade à criopreservação, demanda atenção ainda para o papel dos mesmos no metabolismo energético dos espermatozoides. Fosfatidilcolinas e esfingomielinas possuem diferentes combinações de ácidos graxos de vários comprimentos e saturação, principalmente com ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) de cadeia longa, o que as torna fontes destes para uso no metabolismo oxidativo (LENZI, PICARDO, *et al.*, 1996; FURLAND, ORESTI, *et al.*, 2007; MARTÍNEZ-SOTO, LANDERAS e GADEA, 2013). Além disso, a formação de lisofosfatidilcolinas pela hidrólise de PC promove a liberação de uma cadeia de ácido



graxo (LONGOBARDI, KOSIOR, *et al.*, 2020). Os ácidos graxos livres, oriundos de PC, SM e formação de LPC podem ser carreados por carnitinas para a matriz mitocondrial, contribuindo assim no processo de  $\beta$ -oxidação e produção de ATP (YANG, WANG, *et al.*, 2020; EVANS, DINH, *et al.*, 2020; NAZARI, SALEHPOUR, *et al.*, 2021). Apesar da maior abundância de fosfolipídios nas amostras criopreservadas, os resultados funcionais mostram que o grupo com maior suscetibilidade à criopreservação apresentou uma grande porcentagem de células com problemas na função mitocondrial, com atividade mitocondrial média associada a um potencial de membrana mitocondrial (PMM) baixo. Esta observação levanta a possibilidade de um menor aproveitamento de ácidos graxos de fosfolipídios no metabolismo energético das células do grupo *MaS*, enquanto o oposto pode ter ocorrido com o grupo *MeS*, no qual foram observadas menor concentração de fosfolipídios e uma maior atividade mitocondrial associada à PMM alto. Vale salientar, que os resultados de correlação no grupo *MaS* mostram correlação positiva de PC com baixa atividade mitocondrial, bem como de LPC e SM com potencial de membrana mitocondrial baixo. No entanto, é preciso considerar também que problemas mitocondriais podem estar relacionados com alterações na sua membrana, a qual é igualmente vulnerável ao processo de criopreservação (O'CONNELL, MCCLURE e LEWIS, 2002; UGUR, SABER ABDELRAHMAN, *et al.*, 2019). Por outro lado, no grupo *MeS* foram observadas correlações inversas entre SM e baixa atividade mitocondrial e PMM alto, bem como de PC com PMM médio. Os resultados sugerem que houve um aproveitamento maior de lipídios e carnitinas no momento pré-criopreservação, permitindo a manutenção do *status* funcional das mitocôndrias nas células criopreservadas do grupo com menor suscetibilidade à criopreservação.

Além de sua ação no carreamento de ácidos graxos no metabolismo energético, as carnitinas atuam ainda no controle das concentrações de CoA e acetil-CoA nas mitocôndrias, mecanismos antioxidantes e modulação da fluidez da membrana plasmática (Figuras 86 e 87) (ZOU, YANG, *et al.*, 2017; YANG, WANG, *et al.*, 2020). A maior parte dos estudos se concentra no papel destes metabólitos como cofatores no transporte de ácidos graxos de cadeia longa para a matriz mitocondrial, com destaque maior para a L-carnitina em comparação com seus ésteres (VAZ e WANDERS, 2002; AGARWAL, VIRK, *et al.*, 2014; ALIABADI, MEHRANJANI, *et al.*, 2012). No entanto, vários dos ésteres de L-carnitina possuem

outras funções importantes para a fisiologia da célula espermática. A palmitoil-L-carnitina, por exemplo, está envolvida em mecanismos de modulação da atividade de proteínas e da fluidez da membrana plasmática, enquanto o metabolismo da propionil L-carnitina pode gerar L-carnitina e propionil-CoA, a qual pode ser convertida em succinil-CoA, produto intermediário importante no ciclo do ácido cítrico (HUANG, SHERMAN e LEMPICKI, 2009; AMARAL, LOURENÇO, *et al.*, 2013; MONGIOI, CALOGERO, *et al.*, 2016). A L-carnitina e seus ésteres estão envolvidos ainda em processos antioxidantes, pela remoção de subprodutos do metabolismo celular, como EROs, principalmente na membrana plasmática, evitando em certo grau a peroxidação lipídica (ALIABADI, MEHRANJANI, *et al.*, 2012; YANG, WANG, *et al.*, 2020; NAZARI, SALEHPOUR, *et al.*, 2021). Portanto, os estudos realizados ao longo do tempo deixam cada vez mais clara a importância da presença de carnitinas para a manutenção do metabolismo energético e manutenção da fisiologia e viabilidade dos espermatozoides (MICIC, LALIC, *et al.*, 2019; LAGARES, DA SILVA, *et al.*, 2021).

Os resultados das análises de diferentes amostras biológicas nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação quanto à presença de carnitinas, acompanham, de certa forma, o que foi observado nas classes lipídicas. No plasma seminal, apesar da não detecção de L-carnitina, houve maior concentração de todos os seus ésteres, com exceção apenas da esteroil-L-carnitina, no grupo *MeS*. Este padrão foi praticamente mantido nas análises de células *in natura*, nas quais o grupo *MaS* apresentou apenas maior quantidade de dois ésteres, butiril-L-carnitina e esteroil-L-carnitina. Todavia, o padrão foi revertido nas amostras de células criopreservadas, com o grupo *MaS* apresentando maior presença de L-carnitina e seus ésteres, enquanto no grupo *MeS* houve apenas mais acetilcarnitina. Apesar dos dois grupos apresentarem aumento na concentração da maioria das carnitinas entre os momentos pré e pós-criopreservação, com redução em ambos da quantidade de L-carnitina e acetilcarnitina, os resultados levantam a hipótese do menor aproveitamento das carnitinas pelas células criopreservadas do grupo *MaS*, o que é suportado novamente pelo *status* funcional das mesmas. A maior presença de carnitinas no plasma seminal e nas células *in natura* observada no grupo *MeS*, por outro lado, indica que os espermatozoides deste grupo foram beneficiados pela ação das mesmas no metabolismo energético e em mecanismos antioxidantes, promovendo maior estabilidade no processo de criopreservação. Vale salientar, que

neste grupo os resultados demonstram correlação inversa entre L-carnitina e alta atividade mitocondrial e correlação positiva entre estearoil-L-carnitina e propionil-L-carnitina com potencial de membrana mitocondrial médio e alto, enquanto no grupo *MaS* não foi observada correlação entre carnitinas e função mitocondrial. Quanto à maior presença de acetilcarnitina nas células criopreservadas do grupo *MeS*, é importante notar que, de forma distinta das demais, a acetilcarnitina atua no metabolismo energético por meio da modulação das concentrações de coenzima A (CoA) e acetil-CoA. Isso ocorre pela sua capacidade de doar e receber grupos acetil e pelo controle da atividade das enzimas piruvato desidrogenase e carnitina aciltransferase (LIU, HEAD, *et al.*, 2004; ZOU, YANG, *et al.*, 2017; YANG, WANG, *et al.*, 2020). Desse modo, a maior concentração de acetilcarnitina no grupo *MeS* pode estar relacionada com a alta atividade mitocondrial e PMM alto observados no grupo. Os resultados obtidos neste estudo são corroborados por pesquisas realizadas sobre a presença de carnitinas e viabilidade espermática em várias espécies, como bovinos. Estas demonstram que o uso de carnitinas, como suplemento alimentar ou a sua adição a diluidores, reduz os danos causados pelo processo de criopreservação, como disfunções mitocondriais, perda de motilidade, estresse oxidativo, peroxidação lipídica e fragmentação de DNA (SATO, KUROSAWA, *et al.*, 2008; BUCAK, TUNCER, *et al.*, 2010; ZOU, YANG, *et al.*, 2017; MICIC, LALIC, *et al.*, 2019; LAGARES, DA SILVA, *et al.*, 2021).

### **Perfil de aminoácidos, ácidos orgânicos, nucleosídeos e derivados**

Alterações na função mitocondrial durante o processo de criopreservação, considerando-se ainda que a membrana mitocondrial é tão vulnerável ao processo quanto a membrana plasmática, pode resultar em maior liberação de EROs (O'CONNELL, MCCLURE e LEWIS, 2002; CELEGHINI, DE ARRUDA, *et al.*, 2008; UGUR, SABER ABDELRAHMAN, *et al.*, 2019). Os espermatozoides são mais suscetíveis à quebra da homeostase oxidativa e consequente quadro de estresse oxidativo após a criopreservação, pois o processo leva a uma redução nos níveis de antioxidantes presentes (BÜYÜKLEBLEBICI, TUNCER, *et al.*, 2014; AGARWAL, VIRK, *et al.*, 2014; KUMAR, PRASAD, *et al.*, 2019; GUALTIERI, KALTHUR, *et al.*, 2021). A toxicidade causada pelo excesso de EROs é um dos fatores mais significativos na perda da viabilidade espermática pós-criopreservação, com consequências como inativação de proteínas, peroxidação lipídica e fragmentação

de DNA (UGUR, SABER ABDELRAHMAN, *et al.*, 2019; AITKEN e DREVET, 2020; GUALTIERI, KALTHUR, *et al.*, 2021). Os mecanismos de defesa ao excesso de EROs disponíveis no espermatozoide dependem da disponibilidade de aminoácidos para a formação de moléculas antioxidantes, como por exemplo a glutatona. Este pequeno tripeptídeo, constituído de ácido glutâmico, cisteína e glicina, possui papel antioxidante importante em espermatozoides, atuando ainda como cofator na modulação de enzimas na manutenção da homeostase oxidativa, como a glutatona peroxidase (BILODEAU, CHATTERJEE, *et al.*, 2000; AITKEN e CURRY, 2011; NADRI, TOWHIDI, *et al.*, 2020). A glutatona está presente nas células espermáticas na sua forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), e a concentração de GSH, bem como a razão entre as concentrações GSH/GSSG, são considerados indicadores da presença ou não de quadros de estresse oxidativo em todos os tipos celulares (KOPPERS, DE IULIIS, *et al.*, 2008; BUCAK, TUNCER, *et al.*, 2010; GAUCHER, BOUDIER, *et al.*, 2018).

No presente estudo houve detecção tanto de GSH quanto de GSSG, mas a razão entre ambos não foi calculada pois a quantificação foi realizada de forma distinta para estes metabólitos. Os resultados da comparação entre os grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação mostrou que não houve diferença na quantificação de glutatona e sua forma oxidada no plasma seminal. No entanto, nas células espermáticas *in natura*, foi observado maior concentração de GSH no grupo *MeS*. Quanto a GSSG, apesar de não haver diferença entre os grupos, poderia se considerar uma tendência de maior presença no grupo *MaS* ( $P=0,0596$ ) nas células espermáticas *in natura*, principalmente considerando-se os resultados de PCA, que apontam maior peso deste metabólito sobre este grupo com elevada importância na variância. Nas células criopreservadas, o grupo *MeS* manteve a maior concentração de GSH e não houve diferença entre os grupos quanto à GSSG. Entretanto, nos dois grupos, quando se observa a quantificação pré e pós-criopreservação se observa uma grande redução de GSH acompanhada de um aumento de GSSG. Este resultado corrobora a importância destes metabólitos para combater o excesso de EROs, com a possível associação da maior presença de GSH nas células *in natura* e criopreservadas no grupo *MeS* com a menor presença de EROs observada nos resultados funcionais. Neste grupo houve ainda correlação inversa de GSH com suscetibilidade à fragmentação de DNA, um dos efeitos deletérios da maior presença de EROs em espermatozoides. Em contrapartida, no

grupo *MaS*, que nos resultados funcionais apresentou problemas na função mitocondrial e maior presença de EROs, houve correlação inversa entre GSSG e potencial de membrana mitocondrial médio e alto. A ação da glutathiona para minimizar quadros de estresse oxidativo e seus danos às estruturas espermáticas é objeto de muitos estudos, entre os quais há avaliações dos efeitos da adição de GSH em diluidores para manutenção da homeostase oxidativa no processo de criopreservação (MESEGUER, MARTÍNEZ-CONEJERO, *et al.*, 2007; SHAH, SINGH, *et al.*, 2017; GAUCHER, BOUDIER, *et al.*, 2018; UGUR, SABER ABDELRAHMAN, *et al.*, 2019; NADRI, TOWHIDI, *et al.*, 2020; SALMAN, CAAMAÑO, *et al.*, 2021).

A presença de aminoácidos nas células espermáticas é essencial para manter a sua viabilidade. Estes são precursores de outros aminoácidos, peptídeos, como a glutathiona, e outras macromoléculas necessárias para a fisiologia dos espermatozoides, manutenção da alta demanda de energia pelo bom funcionamento do metabolismo energético e em mecanismos de proteção contra efeitos negativos do acúmulo de EROs (Figura 87) (SANGEETA, ARANGASAMY, *et al.*, 2015; DONG, WU, *et al.*, 2016; ZHAO, ZHANG, *et al.*, 2018; AITKEN e DREVET, 2020; ABDULKAREEM, IBRAHIM, *et al.*, 2020). Aminoácidos e peptídeos são os compostos bioquímicos mais abundantes no plasma seminal de bovinos, visando a proteção dos espermatozoides, no entanto, pouco ainda se sabe sobre a ação de muitos aminoácidos no processo de criopreservação (EGEA, PUCHALT, *et al.*, 2014; SANGEETA, ARANGASAMY, *et al.*, 2015; UGUR, DINH, *et al.*, 2020). Alguns destes, como alanina, glicina, glutamina, histidina e prolina, por exemplo, são utilizados como agentes crioprotetores em várias espécies por agirem como moduladores do mecanismo osmótico e como antioxidantes (NONGBUA, AL-ESSAWE, *et al.*, 2018; UGUR, SABER ABDELRAHMAN, *et al.*, 2019; NADRI, TOWHIDI, *et al.*, 2020). Os resultados observados na comparação dos grupos quanto à presença de aminoácidos no plasma seminal, mostram uma grande diferença na quantificação total de aminoácidos, com o grupo *MeS* apresentando maior concentração de ácidos aspártico e glutâmico, cistina, fenilalanina, glicina, isoleucina, lisina, metionina, prolina, serina, tirosina e triptofano. Em contrapartida, no grupo *MaS* foi observado apenas maior presença de citrulina, hidroxiprolina e dos derivados dimetilglicina (glicina) e quinurenina (triptofano).

A maior presença de vários dos aminoácidos detectados no grupo *MeS* é validada pelos estudos citados acima sobre os benefícios da adição de aminoácidos em diluidores e pelos resultados funcionais observados no grupo. Citando alguns exemplos dos benefícios de maior disponibilidade de aminoácidos no plasma seminal, o ácido glutâmico, cistina (forma estável da cisteína) e glicina, bem como a metionina, são precursores da glutatona, e a metionina, além de atuar na proteção de danos oxidativos, age como quelante de metais, enquanto a prolina, possui ação na estabilização da membrana plasmática (ÇOYAN, BASPINAR, *et al.*, 2010; DONG, WU, *et al.*, 2016; ZHAO, ZHANG, *et al.*, 2018; ABDULKAREEM, IBRAHIM, *et al.*, 2020). A maior concentração observada no plasma seminal do grupo *MeS* se refletiu ainda nas análises das células espermáticas *in natura*, com maior presença neste grupo de todos os aminoácidos que apresentaram diferença. Este resultado demonstra, novamente, que a maior disponibilidade de metabólitos no plasma seminal resulta em uma maior concentração dos mesmos nos espermatozoides no momento pré-congelação, oferecendo maior proteção aos efeitos deletérios da criopreservação. A importância da maior presença de aminoácidos nas células *in natura* é corroborada pelos resultados das análises comparando os momentos pré e pós-criopreservação, os quais demonstram uma redução da quantidade de todos os metabólitos detectados nesta classe nos dois grupos.

A comparação dos grupos quanto às células espermáticas criopreservadas, mostra uma alteração na quantidade das mesmas entre os grupos. O grupo *MeS* manteve maior concentração de ácido glutâmico, metionina, prolina, treonina, valina, glutamina e hidroxiprolina, com a análise de PCA demonstrando a maior importância na variância do ácido glutâmico, metionina e glutamina sobre o grupo. Além dos efeitos benéficos do ácido glutâmico, metionina e prolina, citados acima, a maior presença de glutamina em espermatozoides está relacionada com maior motilidade, proteção da integridade de membranas plasmática e acrossomal e da cromatina (TUNCERA, SARIÖZKANB, *et al.*, 2011; KOOHESTANIDEHAGHI, TORKAMANPARI, *et al.*, 2020). De fato, no grupo *MeS* houve correlação positiva de glutamina com integridade de membrana plasmática e alta atividade mitocondrial, e correlação inversa com células estáticas. Quanto ao grupo *MaS*, o mesmo apresentou maior presença de arginina, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, tirosina, triptofano, citrulina e dimetilglicina nas células criopreservadas. A maior presença de arginina e citrulina observada no grupo se

destaca pelo fato de que os mesmos são substratos para a formação de óxido nítrico (NO<sup>•</sup>) por meio da sua oxidação por NO sintases (NOS). Não foi realizada a quantificação de NO<sup>•</sup> ou NOS neste estudo, mas a maior abundância de seus substratos no grupo levanta a possibilidade de estar relacionada com uma menor produção de NO, molécula que possui papel importante na fisiologia espermática, modulando a motilidade e outros padrões cinéticos, regulando a concentração de AMP cíclico e a fosforilação de tirosina, atuando, portanto, no processo de capacitação (BALERCIA, MORETTI, *et al.*, 2004; AITKEN e DREVET, 2020). No entanto, grande parte dos aminoácidos e derivados com maior presença nas células criopreservadas do grupo *MaS* possuem ação, direta ou indiretamente, antioxidante, como a fenilalanina, glicina, histidina e a dimetilglicina, ou relacionada indiretamente ao metabolismo energético, como precursoras de outros metabólitos (AITKEN, FLANAGAN, *et al.*, 2016; JARAK, ALMEIDA, *et al.*, 2018) (BAI, XU, *et al.*, 2016; ORTIZ-RODRÍGUEZ, MARTÍN-CANO, *et al.*, 2020; UGUR, DINH, *et al.*, 2020; ZHANG, LIU, *et al.*, 2021). Nas análises de correlação, este grupo apresentou correlação inversa entre tirosina, triptofano e citrulina e presença de EROs, e correlação positiva entre triptofano e atividade mitocondrial média. Portanto, considerando-se os resultados metabólicos, funcionais e de correlação, há a possibilidade de que a ação destes aminoácidos e derivados esteja relacionada a uma tentativa de recuperação da homeostase oxidativa bem como da atividade mitocondrial em parte das células deste grupo. De qualquer modo, os resultados sinalizam mais uma vez que a maior presença de aminoácidos nas células *in natura* é mais efetiva no combate aos danos às estruturas espermáticas durante a criopreservação.

A maior parte dos metabólitos detectados neste estudo participa, ainda que indiretamente, do metabolismo energético das células espermáticas. No entanto os pertencentes à classe de ácidos orgânicos possuem, majoritariamente, uma ação direta na produção de ATP por meio do ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa (Figura 88) (TANG, LIU, *et al.*, 2014; VELHO, MENEZES, *et al.*, 2018; PEÑA, ORTIZ-RODRÍGUEZ, *et al.*, 2021). Entre os ácidos orgânicos que participam do ciclo do ácido cítrico (CAC), as amostras de plasma seminal do grupo *MeS* apresentaram maior concentração dos ácidos pirúvico, láctico, málico e succínico, enquanto no grupo *MaS* houve maior quantidade apenas dos ácidos cítrico e isocítrico. A presença destes metabólitos no plasma seminal é importante como fonte

suplementar para as células espermáticas, especialmente antes do processo de criopreservação (VELHO, MENEZES, *et al.*, 2018; MEMILI, MOURA e KAYA, 2020). Além do grupo *MeS* apresentar mais metabólitos em maior concentração, o fato do mesmo ter uma maior disponibilidade dos ácidos pirúvico (piruvato) e láctico (lactato) pode ter proporcionado maior abundância de substratos para o CAC nas células *in natura* do grupo. O piruvato, após entrar na mitocôndria, é oxidado pela piruvato desidrogenase em acetil-CoA, molécula que dá início ao sistema de produção de energia do ciclo (LOSANO, ANGRIMANI, *et al.*, 2018; PEÑA, ORTIZ-RODRÍGUEZ, *et al.*, 2021). No entanto, o lactato pode ser oxidado e convertido à piruvato, sendo um substrato importante para os espermatozoides gerarem piruvato intra-mitocondrial (Figura 88) (ZHAO, ZHANG, *et al.*, 2018; MUMCU, KARAER, *et al.*, 2020; PEÑA, ORTIZ-RODRÍGUEZ, *et al.*, 2021).

Como observado em outras classes metabólicas, as células *in natura* do grupo *MeS* apresentaram maior quantidade da maioria dos ácidos orgânicos participantes do ciclo do ácido cítrico, como os ácidos láctico, málico, succínico, cítrico e isocítrico. A menor concentração de piruvato observada no grupo pode estar relacionada, por sua vez, com o maior consumo deste metabólito no CAC. No entanto, como mencionado acima, o ácido láctico é uma fonte de piruvato, com estudos recentes valorizando a importância da presença do mesmo no metabolismo energético de espermatozoides de várias espécies (VELHO, MENEZES, *et al.*, 2018; MENEZES, VELHO, *et al.*, 2019; MEMILI, MOURA e KAYA, 2020; PEÑA, ORTIZ-RODRÍGUEZ, *et al.*, 2021). Além disso a acetil-CoA, molécula inicial do ciclo, pode ser gerada não apenas a partir da oxidação do piruvato, mas também por meio do metabolismo de ácidos graxos, aminoácidos e pela ação da acetilcarnitina. Em contrapartida, a maior concentração de piruvato observada nas células *in natura* do grupo *MaS* pode ser um indicativo de um menor aproveitamento desta molécula, talvez relacionado com o início de disfunções mitocondriais que foram observadas no momento pós-criopreservação. O padrão de concentração de ácidos orgânicos nas células *in natura* nos grupos estudados é corroborada com a clara separação entre os mesmos observada na PCA, com o ácido pirúvico com maior influência sobre o grupo *MaS* e os ácidos cítrico, isocítrico e málico com maior influência sobre o grupo *MeS*, metabólitos que foram responsáveis pela maior resposta da variância.

Os dois grupos apresentaram padrões muito semelhantes no aumento e redução da quantidade de ácidos orgânicos entre os momentos pré e pós-



criopreservação, entretanto, o perfil observado nas células criopreservadas do grupo *MaS* é bastante distinto daquele das células *in natura*. Este grupo, manteve a maior concentração de piruvato e passou a ter presença mais abundante dos ácidos  $\alpha$ -cetoglutarico, málico e isocítrico. Considerando-se o papel destes no ciclo do ácido cítrico e o *status* mitocondrial observado neste grupo, esta observação levanta a hipótese de que estes metabólitos não foram utilizados de forma ideal na produção de energia. Por outro lado, o grupo *MeS* manteve apenas a maior concentração dos ácidos cítrico e succínico, e o mesmo apresentou alto índice de atividade mitocondrial associado a alto potencial de membrana mitocondrial. Além disso, este grupo apresentou correlação positiva entre ácido cítrico e atividade mitocondrial alta e média. Na PCA, a separação entre os grupos observada para as células *in natura*, foi mantida na análise de células criopreservadas, principalmente por maior influência dos ácidos cítrico e  $\gamma$ -aminobutírico no grupo *MeS*, e do ácido pantotênico sobre o grupo *MaS*.

O ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) é uma importante molécula de sinalização presente em espermatozoides formada pela descarboxilação do ácido glutâmico (PUENTE, TARTAGLIONE e RITTA, 2011). A maior presença de GABA no grupo *MeS*, tanto nas células *in natura* quanto nas criopreservadas, pode ser associada a uma maior viabilidade espermática, com estudos que relacionam a maior presença deste metabólito com maior motilidade, homeostase oxidativa, bem como com fertilidade, pelo fato do mesmo modular os processos de capacitação e reação acrossomal pela ativação ou não de seus receptores (PUENTE, TARTAGLIONE e RITTA, 2011; PAIVA, AMARAL, *et al.*, 2015; MENEZES, VELHO, *et al.*, 2019). Quanto ao ácido pantotênico, os resultados mostram que o grupo *MeS* apresentou maior presença do mesmo nas amostras de células *in natura* e menor nas células criopreservadas em comparação com o grupo *MaS*. Apesar de poucos estudos sobre o papel do ácido pantotênico em espermatozoides, estes resultados podem estar relacionados com sua ação na promoção de síntese e prevenção da degradação de glutathione, promovendo uma atividade antioxidante (WOJTCZAK e SLYSHENKOV, 2003; WALCZAK-JEDRZEJOWSKA, WOLSKI e SLOWIKOWSKA-HILCZER, 2013; SELVARAJU, PARTHIPAN, *et al.*, 2018; AITKEN, DE IULIIS e DREVET, 2019). A maior presença de ácido pantotênico nas células *in natura* do grupo *MeS* pode ter levado à maior concentração de glutathione observada nas células espermáticas nos momentos pré e pós-criopreservação, com a consequente

manutenção da homeostase oxidativa. Por outro lado, a maior contração do metabólito nas células criopreservadas do grupo *MaS*, pode estar relacionada com a tentativa das mesmas em aumentar a produção de glutatona para combater a maior presença de EROs.

Como os ácidos orgânicos, muitos metabólitos da classe de nucleobases, nucleosídeos e derivados são essenciais para o bom funcionamento do metabolismo energético dos espermatozoides, atuando na glicólise e fosforilação oxidativa (Figura 88). Entre estes a adenina e seus derivados constituem o grupo mais estudado na síntese de energia, pelo fato da adenina ser a molécula precursora da adenosina, que por sua vez, pela fosforilação, gera monofosfato (AMP), difosfato (ADP) e trifosfato de adenosina (ATP), e a hidrólise de ATP gera ainda o AMP cíclico (VADNAIS, CAO, *et al.*, 2014; PEÑA, ORTIZ-RODRÍGUEZ, *et al.*, 2021). No metabolismo energético, a adenina é também molécula constituinte dos cofatores nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e da coenzima A (CoA) (SCHUH, HILLE e BABCOCK, 2007; GUARENTE, 2016; PEÑA, ORTIZ-RODRÍGUEZ, *et al.*, 2021). A comparação entre os grupos estudados em plasma seminal, apresentam poucas diferenças quanto à adenina e seus derivados, com o grupo com *MeS* com maior concentração de adenosina e o grupo *MaS* com maior presença de FAD. No entanto, foi observado um perfil bastante distinto entre os grupos nas amostras de células *in natura*, com o grupo *MeS* apresentando maior abundância de 13, entre os 14 metabólitos que apresentaram diferença. Nos espermatozoides pré-criopreservação do grupo *MeS* houve maior quantidade de adenina, adenosina e AMP, com, portanto, maior disponibilidade de substrato para geração de moléculas fundamentais para o metabolismo energético (SCHUH, HILLE e BABCOCK, 2007; VADNAIS, CAO, *et al.*, 2014).

Quanto ao grupo *MaS*, este manteve apenas a maior quantidade de FAD. Esta molécula é parte fundamental na produção de energia no ciclo do ácido cítrico e na cadeia transportadora de elétrons (CTE). No ciclo, a oxidação de succinato em fumarato leva à transferência de dois átomos de hidrogênio ao FAD, com a formação de FADH<sub>2</sub>, o qual, por meio do complexo II da CTE, transfere elétrons para a coenzima Q (Figura 88) (PEÑA, ORTIZ-RODRÍGUEZ, *et al.*, 2021). A maior presença de FAD no grupo *MaS*, atrai atenção pois, além de sua ação no metabolismo energético, o FAD é objeto de estudos em outros tipos de tecidos e células, os quais associam a sua presença à modulação da homeostase celular,

com alterações na concentração de FAD e flavina sendo relacionadas a várias doenças (LI, LU, *et al.*, 2011; LANS, FRAGO e MEDINA, 2012; YEN, RUTER, *et al.*, 2020). Entretanto, estudos sobre a homeostase de FAD em células espermáticas são escassos, com maior atenção à presença e ação de NAD. Resultados de um estudo recente com FAD em modelo animal, visando a avaliação de senescência em humanos e utilizando *knockdown* e mutação de genes, demonstram que a presença de FAD e demais derivados de flavina, é essencial para que o catabolismo mitocondrial de aminoácidos como a prolina ocorra em espermatozoides (YEN, RUTER, *et al.*, 2020).

Quanto às análises de células criopreservadas, o grupo *MeS* manteve a maior quantidade de AMP e passou a ter ainda maior presença de FAD, enquanto o grupo *MaS* apresentou, entre os derivados de adenina, apenas mais AMP cíclico. A maior presença de AMP e FAD no grupo *MeS* reflete o metabolismo energético observado nos resultados funcionais para este grupo. Resultados que são corroborados pelos artigos citados acima, bem como por estudos que demonstram que a maior produção de ATP está associada a um aumento nos níveis de AMP, visto que este é subproduto da produção de ATP a partir de ADP pela reação de transfosforilação por adenilato quinases (AK) (ATKINSON, 1968; VADNAIS, CAO, *et al.*, 2014). Além disso, o grupo *MeS* apresentou correlação positiva entre AMP e motilidade progressiva. A maior presença de AMP cíclico no grupo *MaS*, remete à observação feita anteriormente relacionando a maior quantidade de arginina e citrulina, substratos para a geração de óxido nítrico, que por sua vez regula a concentração de AMP cíclico. Molécula de sinalização importante em vários tipos celulares, nos espermatozoides o AMP cíclico se destaca como mensageiro para ativação dos processos de capacitação e reação acrossomal (BAILEY, BILODEAU e CORMIER, 2000; LEFIÈVRE, JHA, *et al.*, 2002; AITKEN e CURRY, 2011). As análises de cinética realizadas no Experimento 1, demonstram que o grupo *MaS* possui menos células com padrão de linearidade de movimento bem como mais células com maior amplitude de deslocamento lateral de cabeça. Há estudos que associam a maior presença de AMP cíclico com alterações no padrão cinético de espermatozoides (VIJAYARAGHAVAN e HOSKINS, 1986; SCHUH, HILLE e BABCOCK, 2007; YI, SUTOVSKY, *et al.*, 2012). No entanto, mais estudos associando a cinética espermática com capacitação e reação acrossomal são necessários, e a detecção de uma maior concentração de NO e de NOS poderia contribuir para se afirmar que

o grupo possui uma maior porcentagem de células em processo de capacitação e reação acrossomal precoces. Vale citar que, com menor presença de AMP cíclico, o grupo *MeS* apresentou correlação inversa deste metabólito com linearidade.

Na classe de nucleobases e derivados, as células criopreservadas do grupo *MaS* apresentaram maior quantidade de nicotinamida, guanossina e inosina. Quanto à nicotinamida, a sua abundância pode estar relacionada à disfunção mitocondrial observada no grupo, já que este metabólito é precursor de NAD, molécula fundamental para a transferência de elétrons na CTE (GUARENTE, 2016; KANG, HARADA e YAMATOYA, 2020; PEÑA, ORTIZ-RODRÍGUEZ, *et al.*, 2021). Vale mencionar que, neste grupo, houve correlação inversa entre nicotinamida e motilidade progressiva. Considerando-se os resultados funcionais do grupo, com a alteração da função mitocondrial associada a uma maior presença de EROs, é possível que a maior presença conjunta de guanossina e inosina esteja associada a uma possível ação antioxidante para restaurar a homeostase oxidativa, bem como na tentativa das células reestabelecerem a produção de energia. Há estudos com outros tipos celulares que demonstram a ação destes metabólitos na remoção de EROs e em mecanismos que resultam no desvio da produção de energia para a glicólise (JURKOWITZ, LITSKY, *et al.*, 1998; GUDKOV, SHTARKMAN, *et al.*, 2006). A inosina é ainda associada a mecanismos de estímulo de produção de energia pela ativação de piruvato oxidases e da via hipoxantina-inosina como fonte intramitocondrial alternativa para conversão de AMP à ADP e ATP (FABIANI e RONQUIST, 1995; CHU, ZHANG, *et al.*, 2005; ZHANG, LIANG, *et al.*, 2021; TORRES, PEDROSA, *et al.*, 2021). No entanto, é possível que estes mecanismos não tenham sido ativados na grande porcentagem de células com alteração da função mitocondrial identificada no grupo.

Entre os resultados, xantina e hipoxantina se destacam pela influência das mesmas na resposta da variância entre os grupos. Apesar de haver mais xantina no grupo *MeS* e mais hipoxantina no grupo *MaS* nas amostras de plasma seminal, nas demais amostras biológicas o grupo *MeS* manteve maior concentração de ambas. Formadas durante o metabolismo de purinas, xantina e hipoxantina podem ser sintetizadas uma a partir da outra, dependendo da ação das enzimas xantina oxidase ou xantina oxirredutase, respectivamente (BARBATO, TALEVI, *et al.*, 2017). Pelo fato da xantina e da xantina oxidase serem metabólitos pró-oxidativos, participando da formação do ânion superóxido (BARBATO, TALEVI, *et al.*, 2017;

SHARAFI, ZHANDI, *et al.*, 2019), é importante levar-se em consideração a proporção da quantidade dos mesmos observada nas amostras. Apesar de ambas estarem presentes, a hipoxantina possui abundância cerca de dez vezes maior em comparação com a xantina tanto nas células *in natura* quanto nas criopreservadas, corroborando com o *status* oxidativo observado no grupo MeS.

Por fim, o grupo MeS apresentou maior presença de colina nas duas amostras de células espermáticas. A presença maior deste precursor da síntese de vários componentes estruturais, como lipídios de membrana, bem como de moléculas de sinalização e mediação de vários processos fisiológicos do espermatozoide (AGCA, GILMORE, *et al.*, 2002; ZEISEL e DA COSTA, 2009; JOHNSON, LAO, *et al.*, 2012), pode ser mais um fator que contribui para a menor suscetibilidade deste grupo ao processo de criopreservação. Entre os estudos sobre a adição de metabólitos à diluidores, a adição de colina demonstra um aumento da viabilidade de espermatozoides após a criopreservação (AGCA, GILMORE, *et al.*, 2002; DELGADO, LESTER e RORIE, 2018; ACHARYA, BURKE e RORIE, 2020). Os resultados observados demonstram que a manutenção da homeostase metabólica e oxidativa das células espermáticas exige um equilíbrio sofisticado de substratos e cofatores. Tal equilíbrio não foi observado no grupo com maior suscetibilidade à criopreservação, principalmente ao se avaliar os momentos pré e pós-criopreservação.

#### 4.4.5 CONCLUSÃO

Como a fertilidade, a criopreservação de espermatozoides é vista como uma questão multifatorial, apresentando um desafio para várias espécies devido à redução da qualidade seminal e viabilidade dos espermatozoides após a descongelação do sêmen. Apesar de a espécie bovina ser vista como uma das mais resistentes, os espermatozoides que sobrevivem ao processo de criopreservação têm seu *status* funcional comprometido. Muitas pesquisas são realizadas buscando avanços quanto ao uso de diversos diluidores e protocolos, considerando os ganhos de viabilidade espermática pós-criopreservação. Estudos recentes demonstram que a análise dos perfis metabólicos do plasma seminal e células criopreservadas permitem uma visão mais acurada e ampla dos efeitos dos processos de congelação e descongelação em espermatozoides. Ainda assim, este é o primeiro estudo na espécie bovina que avalia o efeito da criopreservação pela análise do perfil metabólico não apenas no plasma seminal e células criopreservadas, mas também do *status* metabólico dos espermatozoides no momento pré-criopreservação.

Este estudo permitiu um maior isolamento dos efeitos da criopreservação por utilizar touros com o mesmo padrão de fertilidade, mantidos há mais de um ano sob o mesmo manejo e com homogeneidade dos grupos estudados quanto à raça. Os resultados das análises funcionais das células criopreservadas demonstrou uma clara diferença entre os grupos com maior e menor suscetibilidade ao processo de criopreservação quanto ao *status* do seu metabolismo energético, oxidativo e preservação ou não de estruturas celulares. Estes resultados, corroborados por vários estudos prévios sobre a queda da viabilidade espermática, foram essenciais para a interpretação dos resultados obtidos nas análises do perfil lipídico e metabólico. As análises de metaboloma sem a observação do *status* funcional das células pode dificultar a interpretação dos resultados. As diferenças entre os grupos quanto ao perfil metabólico do plasma seminal, células *in natura* e criopreservadas, associadas às comparações no mesmo grupo nos momentos pré- e pós-criopreservação, proporcionaram uma visão mais ampla das alterações que ocorrem durante o processo. Além disso, a análise de componentes principais nas diferentes amostras biológicas principais permitiu identificar os metabólitos com maior influência na variância entre os grupos, enquanto a análise de correlação com o *status* funcional propiciou uma base importante para a interpretação dos resultados.

Os resultados obtidos nas análises metabólicas, demonstraram uma diferença clara entre os grupos quanto ao perfil das células espermáticas no momento pré-criopreservação. Esta observação pode ser indicativa de que, mesmo que o plasma seminal seja rico em metabólitos para suprir estas células, a manutenção da viabilidade destes espermatozoides durante a criopreservação depende da sua capacidade de absorver e utilizar estes metabólitos antes do início do processo. Esta observação é corroborada, por exemplo na análise do perfil lipídico, com o grupo com menor suscetibilidade à criopreservação apresentando maior concentração de DHA e colesterol nas células *in natura*, metabólitos que são utilizados em diluidores em estudos para minimizar os efeitos deletérios da criopreservação. Da mesma forma, a maior presença de carnitinas neste grupo pode estar relacionada com a manutenção do *status* funcional das mitocôndrias e da homeostase oxidativa no momento pós-criopreservação neste grupo. Resultados semelhantes foram observados nas amostras com menor suscetibilidade à criopreservação quanto aos demais metabólitos analisados, como aminoácidos, onde deve-se destacar não apenas a maior presença de glutatona mas também de substratos para a geração da mesma, ácidos orgânicos, nucleosídeos e derivados. Estas observações podem indicar que a maior disponibilidade destes metabólitos nas células *in natura* permitiu maior aproveitamento de substratos essenciais para o ciclo do ácido cítrico e cadeia transportadora de elétrons.

Os resultados aqui obtidos demonstram que os espermatozoides dependem não apenas da disponibilidade de metabólitos essenciais para a sua viabilidade pós-criopreservação, mas da sua capacidade, no momento pré-criopreservação, em manter um equilíbrio no metabolismo destas moléculas como substratos, cofatores e vias de produção de energia e manutenção da homeostase oxidativa, preservando, desta forma, estruturas essenciais para o processo de fertilização. Portanto, este estudo demonstra a importância de análises amplas do perfil metabólico associadas ao *status* funcional de espermatozoides no momento pré-criopreservação para maior compreensão dos efeitos deletérios do processo de criopreservação, bem como para direcionar estudos sobre a adição de componentes em diluidores para minimizar estes efeitos.

## REFERÊNCIAS

- ABDULKAREEM, T. A. et al. Effect of adding amino acids combinations to tris extender for improving post cryopreserved semen characteristics of holstein bulls. **Biochem. Cell. Arch.**, 20(1), 2020. 697-701.
- ABIEC. **BeefREPORT - Perfil da Pecuária no Brasil - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes Bovinas**. [S.l.]. 2020.
- ACHARYA, M.; BURKE, J. M.; RORIE, R. W. Effect of semen extender and storage temperature on motility of ram spermatozoa. **Advances in Reproductive Sciences**, 8(1), 2020. ID 97209.
- AGARWAL, A. et al. Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction, 32, 2014. 1-17.
- AGARWAL, A.; SAID, T. M. Carnitines and male infertility. **Reproductive BioMedicine Online**, 8(4), 2004. 376–384.
- AGCA, Y. et al. Osmotic characteristics of mouse spermatozoa in the presence of extenders and sugars. **Biology of Reproduction**, 67(5), 2002. 1493-1501.
- AHUMADA-GUTIERREZ, H. et al. Mechanical properties of bilayers containing sperm sphingomyelins and ceramides with very long-chain polyunsaturated fatty acids. **Chemistry and Physics of Lipids**, 218, 2019. 178-186.
- AITKEN, R. Sperm function tests and fertility. **International Journal of Andrology**, 29, 2006. 69-75.
- AITKEN, R. J. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. **Molecular Reproduction and Development**, 84(10), 2017. 1039-1052.
- AITKEN, R. J. et al. Redox activity associated with the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa, 36, 2004. 994-1010.
- AITKEN, R. J. et al. Involvement of homocysteine, homocysteine thiolactone, and paraoxonase type 1 (PON-1) in the etiology of defective human sperm function. **Andrology**, 4, 2016. 345–360.
- AITKEN, R. J.; BAKER, M. A. Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development. **International Journal of Developmental Biology**, 57, 2013. 265-272.
- AITKEN, R. J.; CURRY, B. J. Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. **Antioxidants & redox signaling**, 14(3), 2011. 367-381.
- AITKEN, R. J.; DE IULIIS, G. N.; DREVET, J. R. Role of oxidative stress in the etiology of male infertility and the potential therapeutic value of antioxidants. In: HENKEL, R.; SAMANTA, L.; AGARWAL, A. **Oxidants, antioxidants and impact of the oxidative status in male reproduction**. [S.l.]: Academic Press, v. 1, 2019. Cap. 2.2.
- AITKEN, R. J.; DREVET, J. R. The Importance of Oxidative Stress in Determining the Functionality of Mammalian Spermatozoa: A Two-Edged Sword. **Antioxidants**, 9(2), 2020. 111-130.
- AKSOY, Y. et al. Sperm fatty acid composition in subfertile men. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, 75(2), 2006. 75–79.
- ALIABADI, E. et al. Effects of L-carnitine and L-acetyl-carnitine on testicular sperm motility and chromatin quality. **Iran J Reprod Med.**, 10(2), 2012. 77–82.



- ALVES, D. D. Amino acids nutrition in bovine. **R. bras. Agrociência**, 10(3), 2004. 265-271.
- ALVES, M. B. R. et al. MicroRNAs: a new approach to predict fertility in bulls. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, 41(1), 2017. 46-53.
- ALWARAWRAH, M.; DAI, J.; HUANG, J. Modification of Lipid Bilayer Structure by Diacylglycerol: A Comparative Study of Diacylglycerol and Cholesterol. **J Chem Theory Comput**, 8(2), 2012. 749-758.
- AMARAL, A. et al. Mitochondria functionality and sperm quality. **Reproduction**, 146, 2013. R163-R174.
- AM-IN, N. et al. Lipid profiles of sperm and seminal plasma from boars having normal or low sperm motility. **Theriogenology**, 75(5), 2011. 897–903.
- AMORIM, E. A. M. et al. Effect of cholesterol or cholesteryl conjugates on the cryosurvival of bull sperm. **Cryobiology**, 58, 2009. 210-214.
- ANDRADE, J. S. et al. Aspectos uterinos, foliculares e seminais que afetam a IATF em vacas de corte no período pós-parto. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, 42(3), 2018. 77-89.
- ARGOV-ARGAMAN, N. et al. Variation in lipid profiles within semen compartments-the bovine model of aging. **Theriogenology**, 80(7), 2013. 712-721.
- ATKINSON, D. E. Energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter: Interaction with feedback modifiers. **Biochemistry**, 7(11), 1968. 4030–4034.
- BAI, K. W. et al. Assessment of free radical scavenging activity of dimethylglycine sodium salt and its role in providing protection against lipopolysaccharide-induced oxidative stress in mice. **PLoS One**, 11, 2016. e01553932016.
- BAI, K. W. et al. Dimethylglycine sodium salt protects against oxidative damage and mitochondrial dysfunction in the small intestines of mice. **International Journal of Molecular Medicine**, 43, 2019. 2199-2211.
- BAILEY, J. L.; BILODEAU, J. F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon, 21, 2000. 1-7.
- BAILEY, J. L.; MORRIE, A.; CORMIER, N. Semen cryopreservation: success and persistent in farm species, 83, 2003. 393-401.
- BALERCIA, G. et al. Role of Nitric Oxide Concentrations on Human Sperm Motility. **Journal of Andrology**, 25, 2004. 245-249.
- BARBATO, V. et al. Supplementation of sperm media with zinc, D-aspartate and co-enzyme Q10 protects bull sperm against exogenous oxidative stress and improves their ability to support embryo development. **Zygote**, 25(2), 2017. 168-175.
- BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. [S.l.]: Iowa State University Press, 1989. 285 p.
- BARUSELLI, P. S. **Avaliação da eficiência reprodutiva - Impacto da fertilidade do touro**. epto de Reprodução Animal – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP. [S.l.]. 2019.
- BATELLIER, F. et al. Advances in cooled semen technology. **Anim. Reprod. Sci.**, 68, 2001. 181-190.

- BIANCHI, G. et al. Synthesis of glutathione in response to methionine load in control subjects and in patients with cirrhosis. **Metabolism**, 49(11), 2000. 1434-1439.
- BIENIEK, J. M.; DRABOVICH, A. P.; LO, K. C. Seminal biomarkers for the evaluation of male infertility. **Asian J Androl**, 18(3), 2016. 426-433.
- BILODEAU, J.-F. et al. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Mol Reprod Dev.**, 55, 2000. 282-288.
- BLANCH, E. et al. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrins and two diluents on boar sperm cryosurvival. **Reproduction in Domestic Animals**, 43, 2008. 71-72.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, 37(8), 1959. 911-917.
- BLUMER, C. G. et al. Effect of varicocele on sperm function and semen oxidative stress. **BJU Int**, 109, 2012. 259–265.
- BREITBART, H. Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction, 187, 2002. 139-144.
- BREWIS, I. A. et al. Measurement of Intracellular Calcium Concentration and Plasma Membrane Potential in Human Spermatozoa Using Flow Cytometry, 21, 2000. 238-249.
- BUCAK, M. N. et al. Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: Antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. **Cryobiology**, 61(3), 2010. 248-253.
- BÜYÜKLEBLEBİCİ, S. et al. Cryopreservation of bull sperm: Effects of extender supplemented with different cryoprotectants and antioxidants on sperm motility, antioxidant capacity and fertility results. **Animal Reproduction Science**, 150, 2014. 77-83.
- CALDEIRA DA SILVA, C. C. et al. Mild mitochondrial uncoupling in mice affects energy metabolism, redox balance and longevity. **Aging Cell**, 7, 2008. 552–560.
- CASILLAS, E. R. Accumulation of carnitine by bovine spermatozoa during maturation in the epididymis. **J Biol Chem.**, 248(23), 1973. 8227-32.
- CELEGHINI, E. C. C. et al. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, 104, 2008. 119–131.
- CELEGHINI, E. C. C. et al. Impact of semen quality on field fertility in cattle. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, 41(1), 2017. 40-45.
- CELEGHINI, E. et al. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, 42(5), 2007. 479-488.
- CEPEA/USP. **PIB DO AGRONEGÓCIO**. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada - ESALQ - USP. [S.l.]. 2021.
- CHU, J. et al. Correlation between key enzyme activities in the inosine synthetic pathway and inosine production. **Process Biochemistry**, 40(2), 2005. 891-894.
- CLEGG, E. D.; FOOTE, R. H. Phospholipid Composition of Bovine Sperm Fractions, Seminal Plasma and Cytoplasmic Droplets. **J. Reprod. Fertil.**, 34, 1973. 379–383.

- COLLIN, S. et al. Sperm calcium levels and chlortetracycline fluorescence patterns are related to the in vivo fertility of cryopreserved bovine semen. **J Androl.**, 21, 2000. 938–943.
- ÇOYAN, K. et al. Influence of methionine and dithioerythritol on sperm motility, lipid peroxidation and antioxidant capacities during liquid storage of ram semen. **Research in Veterinary Science**, 89, 2010. 426-431.
- CRAIG, L. B. et al. Decreased very long chain polyunsaturated fatty acids in sperm correlates with sperm quantity and quality. **J. Assist. Reprod. Genet.**, 36, 2019. 1379–1385.
- CRITSER, J. K. et al. Cryopreservation of human spermatozoa. II. Post thaw chronology of motility and of zona-free hamster ova penetration. **Fertil. Steril.**, 47, 1987. 980–987.
- CROSS, N. L. Role of Cholesterol in Sperm Capacitation. **Biology of Reproduction**, 59, 1998. 7–11.
- CROSS, N. L. Sphingomyelin modulates capacitation of human sperm in vitro. **Biol Reprod**, 63(4), 2000. 1129-34.
- CRV LAGOA. **Conheça o IFERT™ - Índice de fertilidade na IATF.** [S.l.]. 2018.
- CUIA, Z.; HOUWELING, M. Phosphatidylcholine and cell death. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1585, 2002. 87-96.
- D'ANIELLO, G. et al. D-Aspartate, a Key Element for the Improvement of Sperm Quality. **Advances in Sexual Medicine**, 2(4), 2012. 24016.
- D'OCCHIO, M. J.; BARUSELLI, P. S.; CAMPANILE, G. Metabolic health, the metabolome and reproduction in female cattle: a review. **Italian Journal of Animal Science**, 18(1), 2019. 858-867.
- DE CASTRO, L. S. et al. Sperm oxidative stress is detrimental to embryo development: a dose-dependent study model and a New and more sensitive oxidative status evaluation, 2016, 2016. 8213071.
- DE LAMIRANDE, E. et al. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Rev Reprod**, 2, 1997. 48–54.
- DE LAS HERAS, M. A.; VALCARCEL, A.; PEREZ, L. J. In Vitro Capacitating Effect of Gamma-Aminobutyric Acid in Ram Spermatozoa. **Biology of Reproduction**, 56(4), 1997. 964–968.
- DELGADO, P.; LESTER, T.; RORIE, R. W. Effect of low-sodium, choline-based semen diluent on viability of bovine spermatozoa stored at 4°C. **Advances in Reproductive Sciences**, 6, 2018. 12-21.
- DIKMEN, S. et al. Determination of the optimum contribution of Brahman genetics in an Angus-Brahman multibreed herd for regulation of body temperature during hot weather. **J Anim Sci.**, 96(6), 2018. 2175-2183.
- DONG, H. et al. Effect of dietary supplementation with amino acids on boar sperm quality and fertility. **Animal Reproduction Science**, 172, 2016. 182-189.
- DU PLESSIS, S. S. et al. Proteomics: a subcellular look at spermatozoa, 9(36), 2011.
- EGEA, R. R. et al. OMICS: Current and future perspectives in reproductive medicine and technology. **J Hum Reprod Sci**, 7(2), 2014. 73-92.
- ENGEL, K. M. et al. Metabolomic profiling reveals correlations between spermiogram parameters and the metabolites present in human spermatozoa and seminal plasma. **PLOS ONE**, 14(2), 2019. e0211679.

- EVANS, H. C. et al. Lipidomic markers of sperm cryotolerance in cattle. **Sci. Rep.**, 10, 2020. 20192.
- EVENSON, D.; JOST, L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. **Methods Cell Sci**, 22, 2000. 169-89.
- FABIANI, R.; RONQUIST, G. Abundance of guanine, guanosine, inosine and adenosine in human seminal plasma. **International Journal of Clinical and Laboratory Research**, 25(1), 1995. 47-51.
- FERNÁNDEZ, S.; CÓRDOBA, M. A membrane-associated adenylate cyclase modulates lactate dehydrogenase and creatine kinase activities required for bull sperm capacitation induced by hyaluronic acid. **Animal Reproduction Science**, 179, 2017. 80-87.
- FLESH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm membrane in the process of fertilization. **Biochim. Biophys. Acta**, 1469, 2000. 197-235.
- FU, L. et al. Glycolysis metabolic changes in sperm cryopreservation based on a targeted metabolomic strategy. **Int J Clin Exp Pathol**, 12(5), 2019. 1775–1781.
- FURLAND, N. E. et al. Very Long-chain Polyunsaturated Fatty Acids Are the Major Acyl Groups of Sphingomyelins and Ceramides in the Head of Mammalian Spermatozoa. **The Journal of Biological Chemistry**, 282, 2007. 18151–18161.
- GADELLA, B. M. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. **Animal Reproduction Science**, 107(3), 2008. 229-236.
- GADELLA, B. M. et al. Glycolipid migration from the apical to the equatorial subdomains of the sperm head plasma membrane precedes the acrosome reaction. **Journal of Cell Science**, 108, 1995. 935-945.
- GADELLA, B. M. et al. Sperm head membrane reorganisation during capacitation, 52, 2008. 473-480.
- GALARZA, D. A.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A.; SANTIAGO-MORENO, J. Supplementing a skimmed milk–egg yolk-based extender with L-carnitine helps maintain the motility, membrane integrity and fertilizing capacity of chilled ram sperm. **Reprod Dom Anim**, 55, 2020. 805-813.
- GALLON, F. et al. The functionality of mitochondria differentiates human spermatozoa with high and low fertilizing capability. **Fertility and Sterility**, 86, 2006. 1526-1530.
- GAROLLA, A. et al. Impaired sperm function in infertile men relies on the membrane sterol pattern. **Andrology**, 6, 2018. 325-334.
- GAUCHER, C. et al. Glutathione: Antioxidant Properties Dedicated to Nanotechnologies. **Antioxidants**, 7(5), 2018. 62.
- GLIOZZI, T. et al. The combination of kinetic and flow cytometric semen parameters as a tool to predict fertility in cryopreserved bull semen. **Animal**, 11, 2017. 1975-1982.
- GOOVAERTS, I. G. F. et al. Evaluation of epididymal semen quality using the Hamilton–Thorne analyser indicates variation between the two caudae epididymides of the same bull. **Theriogenology**, 66, 2006. 323–330.
- GRAHAM, J. K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Animal Reproduction Science**, 68(3), 2001. 239-247.
- GRAHAM, J.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology**, 64, 2005. 492-504.

- GUALTIERI, R. et al. Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress Caused by Cryopreservation in Reproductive Cells. **Antioxidants**, 10(3), 2021. 337-361.
- GUARENTE, L. Cell metabolism the resurgence of NAD<sup>+</sup>. **Science**, 352, 2016. 1396–1397.
- GUDKOV, S. V. et al. Guanosine and inosine display antioxidant activity, protect DNA in vitro from oxidative damage induced by reactive oxygen species, and serve as radioprotectors in mice. **Radiat. Res.**, 165, 2006. 538-545.
- GUENGERICH, F. P. Thematic Minireview Series on Biological Applications of Mass Spectrometry. **The journal of biological chemistry**, 286(29), 2011. 25417.
- GUO, L. et al. Roles of Sphingosine-1-Phosphate in Reproduction. **Reprod Sci.**, 21(5), 2014. 550–554.
- HAILAT, T. et al. The Functional Role of Platelet-Activating Factor in Spermatozoa Physiology. **Journal of Bioscience & Biomedical Engineering**, 2(2), 2021. 1-5.
- HALANGK, W. et al. Effect of various substrates on mitochondrial and cellular energy state of intact spermatozoa. **Biomedica Biochimica Acta**, 44(3), 1985. 411-420.
- HALL, V. et al. Early embryonic development, assisted reproductive technologies, and pluripotent stem cell biology in domestic mammals. **Vet J**, 197(2), 2013. 128-142.
- HAMAMAH, S. et al. 1H nuclear magnetic resonance studies of seminal plasma from fertile and infertile men. **Journal of Reproduction and Fertility**, 97, 1993. 51–55.
- HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; AND RYAN, P. D. Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, 4, 2001. 9.
- HARMSSEN, E. et al. Enhanced ATP and GTP synthesis from hypoxanthine or inosine after myocardial ischemia. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, 246(1), 1984. H37-H43.
- HERNÁNDEZ-AVILÉS, C. et al. The effects of metabolic substrates glucose, pyruvate, and lactate added to a skim milk-based semen extender for cooled storage of stallion sperm. **Theriogenology**, 161, 2021. 83-97.
- HERNVANN, A. et al. Amino Acid Content of Human Semen in Normal and Infertility Cases. **Andrologia**, 18(5), 1986. 461-469.
- HO, C. S. et al. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. **Clin Biochem Rev**, 24(1), 2003. 3–12.
- HOLT, V. W. et al. Direct observation of cold-shock effects in ram spermatozoa with the use of a programmable cryomicroscope. **J. Exp. Zool.**, 246, 1988. 305–314.
- HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences, 53, 2000. 47-58.
- HOSSAIN, M. S. et al. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. **Asian journal of andrology**, 13(3), 2011. 406.
- HOUSTON, B.; CURRY, B.; AITKEN, R. J. Human spermatozoa possess an IL4I1 L-amino acid oxidase with a potential role in sperm function. **Reproduction**, 149(6), 2015. 587-596.

- HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. **International Journal of Andrology**, 10, 1987. 809-28.
- HUANG, D. W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. **Nucleic Acids Res.**, 37(1), 2009. 1-13.
- HUANG, D. W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. **Nature Protocols**, 4(1), 2009. 44 - 57.
- HUSZAR, G.; VIGUE, L.; OEHNINGER, S. Creatine kinase immunocytochemistry of human sperm-hemizona complexes: selective binding of sperm with mature creatine kinase-staining pattern. **Fertility and Sterility**, 61(1), 1994. 136-142.
- JAGAN MOHANARAO, G.; ATREJA, S. K. Identification of capacitation associated tyrosine phosphoproteins in buffalo (*Bubalus bubalis*) and cattle spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, 123(1), 2011. 40-47.
- JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. **Theriogenology**, 60(4), 2003. 743-758.
- JARAK, I. et al. Senescence and declining reproductive potential: Insight into molecular mechanisms through testicular metabolomics. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1864(10), 2018. 3388-3396.
- JARVI, K. et al. Effect of platelet-activating factor, lyso-platelet-activating factor, and lysophosphatidylcholine on sperm motion: importance of albumin for motility stimulation. **Fertility and Sterility**, 59(6), 1993. 1266-1275.
- JOHNSON, A. R. et al. Choline dehydrogenase polymorphism rs12676 is a functional variation and is associated with changes in human sperm cell function. **PLOS ONE**, 7(4), 2012. e36047.
- JURKOWITZ, M. S. et al. Adenosine, Inosine, and Guanosine Protect Glial Cells During Glucose Deprivation and Mitochondrial Inhibition: Correlation Between Protection and ATP Preservation. **Journal of Neurochemistry**, 71, 1998. 535-548.
- KANG, W.; HARADA, Y.; YAMATOYA, K. E. A. Extra-mitochondrial citrate synthase initiates calcium oscillation and suppresses age-dependent sperm dysfunction. **Lab Invest**, 100, 2020. 583-595.
- KARUNAKARAN, M.; DEVANATHAN, T. Evaluation of bull semen for fertility-associated protein, in vitro characters and fertility. **Journal of Applied Animal Research**, 45(1), 2017. 136-144.
- KASTELIC, J. P.; THUNDATHIL, J. C. Breeding Soundness Evaluation and Semen Analysis for Predicting Bull Fertility. **Reprod Dom Anim**, 43(2), 2008. 368-373.
- KATO, Y.; NAGAO, Y. Changes in sperm motility and capacitation induce chromosomal aberration of the bovine embryo following intracytoplasmic sperm injection. **PLoS One**, 10(6), 2015. e0129285.
- KEBER, R.; ROZMAN, D.; HORVAT, S. Sterols in spermatogenesis and sperm maturation. **Journal of Lipid Research**, 54, 2013. 20-33.
- KHOSROZADEH, F. et al. Preconditioning of bull semen with sub-lethal oxidative stress before cryopreservation: Possible mechanism of mitochondrial uncoupling protein 2. **Cryobiology**, S0011-2240(21), 2021.

- KIM, S. et al. PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces. **Nucleic Acids Res.**, 49, 2021. D1388–D1395.
- KIZILAY, F.; ALTAY, B. Sperm function tests in clinical practice. **Turkish Journal of Urology**, 43(4), 2017. 393.
- KOOHESTANIDEHAGHI, Y. et al. The effect of cysteine and glutamine on human sperm functional parameters during vitrification. **Andrologia**, 0, 2020. e13870.
- KOPPERS, A. J. et al. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. **J Clin Endocrinol Metab**, 93, 2008. 3199–3207.
- KUMAR, A. et al. Fertility-associated metabolites in bull seminal plasma and blood serum: <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance analysis. **Molecular Reproduction & Development**, 82(2), 2015. 123-131.
- KUMAR, A. et al. Strategies to Minimize Various Stress-Related Freeze–Thaw Damages During Conventional Cryopreservation of Mammalian Spermatozoa. **Biopreservation and Biobanking**, 17(6), 2019. 603-612.
- LAGARES, M. D. A. et al. L-carnitine added to post-thawed semen acts as an antioxidant and a stimulator of equine sperm metabolism. **Andrologia**, 0, 2021. e14338.
- LALANCETTE, C.; FAURE, R. L.; LECLERC, P. Identification of the proteins present in the bull sperm cytosolic fraction enriched in tyrosine kinase activity: a proteomic approach, 6(16), 2006. 4523-4540.
- LANS, I.; FRAGO, S.; MEDINA, M. Understanding the FMN cofactor chemistry within the Anabaena Flavodoxin environment. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, 1817(12), 2012. 2118-2127.
- LAYEK, S. S. et al. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders, 172, 2016. 1-9.
- LAZZARINO, G. et al. Low-molecular weight compounds in human seminal plasma as potential biomarkers of male infertility. **Human Reproduction**, 33(10), 2018. 1817–1828.
- LE, M. T. et al. Does conventional freezing affect sperm DNA fragmentation? **Clin Exp Reprod Med**, 46(2), 2019. 67-75.
- LEAHY, T.; GADELLA, B. M. New insights into the regulation of cholesterol efflux from the sperm membrane. **Asian Journal of Andrology**, 17, 2015. 561–567.
- LEE, S. et al. The Effectiveness of Anti-Apoptotic Agents to Preserve Primordial Follicles and Prevent Tissue Damage during Ovarian Tissue Cryopreservation and Xenotransplantation. **Int. J. Mol. Sci.**, 22, 2021. 2534.
- LEES, A. M. et al. The Impact of Heat Load on Cattle. **Animals**, 9, 2019. 322.
- LEFFLER, K. S.; WALTERS, C. A. A comparison of time, temperature, and freezing variables on frozen sperm motility recovery. **Fertil. Steril.**, 65, 1996. 282–284.
- LEFIÈVRE, L. et al. Activation of protein kinase A during human sperm capacitation and acrosome reaction. **J Androl.**, 23(5), 2002. 709-716.
- LENZI, A. et al. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. **Human Reproduction Update**, 2(3), 1996. 246–256.

- LI, S. et al. QSOX2, a FAD-dependent sulfhydryl oxidase, can agglutinate mouse sperm and inhibit acrosome reaction. **Biology of Reproduction**, 85(1), 2011. 503.
- LIU, J. et al. Comparison of the effects of L-carnitine and acetyl-L-carnitine on carnitine levels, ambulatory activity, and oxidative stress biomarkers in the brain of old rats. **Ann N Y Acad Sci**, 1033, 2004. 117-31.
- LIU, K.-S. et al. The influence of sperm dna damage and semen homocysteine on male infertility. **Reproductive and Developmental Medicine**, 1(4), 2017. 228-232.
- LONE, S. A. Possible mechanisms of cholesterol-loaded cyclodextrin action on sperm during cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, 192, 2018. 1-5.
- LONERGAN, P. State-of-the-art embryo technologies in cattle, 64, 2007. 315-25.
- LONGOBARDI, V. et al. Changes in Bull Semen Metabolome in Relation to Cryopreservation and Fertility. **Animals**, 10(6), 2020. 1065.
- LOSANO, J. D. A. et al. Effect of mitochondrial uncoupling and glycolysis inhibition on ram sperm functionality. **Reproduction in Domestic Animals**, 52(2), 2017. 289-297.
- LOSANO, J. D. A. et al. Spermatid mitochondria: role in oxidative homeostasis, sperm function and possible tools for their assessment. **Zygote**, 26(4), 2018. 251-260.
- LOSANO, J. D. A. et al. The addition of docosahexaenoic acid (DHA) and antioxidants (glutathione peroxidase and superoxide dismutase) in extenders to epididymal sperm cryopreservation in bulls. **Zygote**, 26(3), 2018. 199-206.
- LOSANO, J. D. et al. Utilisation of sperm-binding assay combined with computer-assisted sperm analysis to evaluate frozen-thawed bull semen. **Andrologia**, 47(1), 2015. 77-84.
- MACIEL, V. L. et al. L-arginine alters the proteome of frozen-thawed bovine sperm during in vitro capacitation. **Theriogenology**, 119, 2018. 1-9.
- MALO, C. et al. Anti-oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: Comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). **Cryobiology**, 61(1), 2010. 142-147.
- MANDAL, R.; BADYAKAR, D.; CHAKRABARTY, J. Role of Membrane Lipid Fatty Acids in Sperm Cryopreservation. **Advances in Andrology**, 2014, 2014. ID 190542.
- MARACCHI, G.; SIROTENKO, O.; BINDI, M. Impacts of Present and Future Climate Variability on Agriculture and Forestry in the Temperate Regions: Europe. **Climatic Change**, 70, 2005. 117-135.
- MARCHETTI, C. et al. Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. **Human Reproduction**, 17, 2002. 1257–1265.
- MARTIN, G. et al. Kinetics of occurrence of some features of apoptosis during the cryopreservation process of bovine spermatozoa. **Human Reproduction**, 22, n. 2, 2007. 380–388.
- MARTÍNEZ-SOTO, J. C.; LANDERAS, J.; GADEA, J. Spermatozoa and seminal plasma fatty acids as predictors of cryopreservation success. **Andrology**, 1(3), 2013. 365–375.
- MEHRPARAVAR, B. et al. Metabolomics of Male Infertility: A New Tool for Diagnostic Tests. **J Reprod Infertil.**, 20(2), 2019. 64-69.



- MEMILI, E.; MOURA, A. A.; KAYA, A. Metabolomes of sperm and seminal plasma associated with bull fertility. **Animal Reproduction Science**, 220, 2020. 106355.
- MENEZES, E. B. et al. Uncovering sperm metabolome to discover biomarkers for bull fertility. **BMC Genomics**, 20, 2019. 714 (1-16).
- MESEGUER, M. et al. The human sperm glutathione system: a key role in male fertility and successful cryopreservation. **Drug Metab Lett.**, 1(2), 2007. 121-126.
- MICIC, S. et al. Double-blind, randomised, placebo-controlled trial on the effect of L-carnitine and L-acetylcarnitine on sperm parameters in men with idiopathic oligoasthenozoospermia. **Andrologia**, 51, 2019. e13267.
- MIRAGLIA, E. et al. Nitric oxide stimulates human sperm motility via activation of the cyclic GMP/protein kinase G signaling pathway. **Reproduction**, 141(1), 2011. 47–54.
- MOCÉ, E. et al. Use of Cholesterol in Sperm Cryopreservation: Present Moment and Perspectives to Future. **Reproduction in Domestic Animals**, 45, 2010. 57-66.
- MONGIOI, L. et al. The role of carnitine in male infertility. **Andrology**, 4, 2016. 800–807.
- MORRELL, J. M. et al. Sperm quality variables as indicators of bull fertility may be breed dependent. **Animal Reproduction Science**, 185, 2017. 42-52.
- MOTHA, R. P.; BAIER, W. Impacts of Present and Future Climate Change and Climate Variability on Agriculture in the Temperate Regions: North America. **Climatic Change**, 70, 2005. 137-164.
- MOURA, A. A. et al. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach, 27(2), 2006. 201-211.
- MULLER, K. et al. Characterization of Sperm Plasma Membrane Properties after Cholesterol Modification: Consequences for Cryopreservation of Rainbow Trout Spermatozoa. **Biology of Reproduction**, 78, 2008. 390–399.
- MUMCU, A. et al. Metabolomics analysis of seminal plasma in patients with idiopathic Oligoasthenoteratozoospermia using high-resolution NMR spectroscopy. **Andrologia**, 8, 2020. 450-456.
- MURASE, T. et al. Hyperactivated motility of frozen-thawed spermatozoa from fertile and subfertile japanese Black bulls induced by cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate analogue, cBiMPS. **Journal of Reproduction and Development**, 56(1), 2010. 36-40.
- NADRI, T. et al. Supplemental Glutathione Improves Post-Thaw Quality of Holstein Bulls Sperm in a Nanomicelle based Extender. **Iranian Journal of Applied Animal Science**, 10(4), 2020. 615-622.
- NARESH, S.; ATREJA, S. Detection, Localization and Tyrosine Phosphorylation Status of Ser/Thr Protein Phosphatase1 $\gamma$  in Freshly Ejaculated, In Vitro Capacitated and Cryopreserved Buffalo Spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, 50(6), 2015. 901-909.
- NARUD, B. et al. Differences in sperm functionality and intracellular metabolites in Norwegian Red bulls of contrasting fertility. **Theriogenology**, 257, 2020. 24-32.
- NASIRI, A. H.; TOWHIDI, A.; ZEINOALDINI, S. Combined effect of DHA and  $\alpha$ -tocopherol supplementation during bull semen cryopreservation on sperm characteristics and fatty acid composition. **Andrologia**, 44, 2012. 550–555.

- NAZARI, L. et al. Effect of antioxidant supplementation containing L-carnitine on semen parameters: a prospective interventional study. **JBRA Assisted Reproduction**, 25(1), 2021. 76-80.
- NICHI, M. et al. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions, 66, 2006. 822-828.
- NICHI, M. et al. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34°C, 67, 2007. 334-340.
- NONGBUA, T. et al. Adding bovine seminal plasma prior to freezing improves post-thaw bull sperm kinematics but decreases mitochondrial activity. **Syst Biol Reprod Med.**, 64(3), 2018. 183-190.
- O'CONNELL, M.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. E. M. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function, 17, 2002. 704-709.
- ODEH, A. I. et al. Effect of platelet-activating factor (PAF) on stallion sperm motility, capacitation and the acrosome reaction. **Reproduction**, 126(5), 2003. 605-613.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; K., Y. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, 95, 1979. 351-8.
- ORTEGA-FERRUSOLA, C. et al. Detection of "Apoptosis-Like" Changes During the Cryopreservation Process in Equine Sperm. **Journal of Andrology**, 29(2), 2008. 213-221.
- ORTIZ-RODRÍGUEZ, J. M. et al. The SLC7A11: sperm mitochondrial function and non-canonical glutamate metabolism. **Reproduction**, 160, 2020. 803-818.
- OZKAVUKCU, S. et al. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. **J Assist Reprod Genet**, 25, 2008. 403-411.
- PAIVA, C. et al. Identification of endogenous metabolites in human sperm cells using proton nuclear magnetic resonance (1H-NMR) spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **Andrology**, 3, 2015. 496-505.
- PANG, Z. et al. MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. **Nucl. Acids Res.**, 49, 2021. 388-396.
- PARKS, J. E.; LYNCH, D. V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, 29(2), 1992. 255-266.
- PARRISH, J. J. et al. Capacitation of Bovine Sperm by Heparin. **Biology of reproduction**, 38, 1988. 1171-80.
- PATTI, G. J.; YANES, O.; G., S. Innovation: metabolomics, the apogee of the omics trilogy. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, 13, 2012. 263-269.
- PEDDINTI, D. et al. Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility, 2(19), 2008.
- PEÑA, F. J. et al. An integrated overview on the regulation of sperm metabolism (glycolysis-Krebs cycle-oxidative phosphorylation). **Animal Reproduction Science**, 0, 2021. 106805.
- PETRUNKINA, A. M. Fundamental Aspects of Gamete Cryobiology, 4(2), 2007. 78-91.

- PUENTE, M. A.; TARTAGLIONE, C. M.; RITTA, M. N. Bull sperm acrosome reaction induced by gamma-aminobutyric acid (GABA) is mediated by GABAergic receptors type A. **Animal Reproduction Science**, 127, 2011. 31-37.
- QIU, J. et al. Effects of glucose metabolism pathways on sperm motility and oxidative status during long-term liquid storage of goat semen. **Theriogenology**, 86(3), 2016. 839-849.
- RESTLE, J. et al. Efeito do grupo genético e da heterose nas características quantitativas da carcaça de vacas de descarte terminadas em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 31(1), 2002. 350-362.
- RIBAS, G. S.; VARGAS, C. R.; WAJNER, M. L-carnitine supplementation as a potential antioxidant therapy for inherited neurometabolic disorders. **Gene**, 533, 2014. 469-476.
- ROUDEBUSH, W. E. Role of platelet-activating factor in reproduction: sperm function. **Asian J Androl**, 3(2), 2001. 81-85.
- SABÉS-ALSINA, M. et al. Relationships between climate and sperm quality in dairy bull semen: A retrospective analysis. **Journal of Dairy Science**, 102(6), 2019. 5623-5633.
- SALMAN, A. et al. Supplementation of the BIOXcell extender with the antioxidants crocin, curcumin and GSH for freezing bull semen. **Research in Veterinary Science**, 136, 2021. 444-452.
- SANGEETA, S. et al. Role of amino acids as additives on sperm motility, plasma membrane integrity and lipid peroxidation levels at pre-freeze and post-thawed ram semen. **Animal Reproduction Science**, 161, 2015. 82-88.
- SARIÖZKAN, S. et al. The influence of cysteine and taurine on microscopic–oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. **Cryobiology**, 58, 2009. 134–138.
- SASTRY, B. V.; JANSON, V. E.; CHATURVEDI, A. K. Inhibition of human sperm motility by inhibitors of choline acetyltransferase. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 216(2), 1981. 378-384.
- SATO, M. et al. Effect of L-carnitine supplementation to bulls on sperm motility maintenance under high environmental temperatures. **Animal Behaviour and Management**, 44(4), 2008. 245-250.
- SCHUH, S. M.; HILLE, B.; BABCOCK, D. F. Adenosine and Catecholamine Agonists Speed the Flagellar Beat of Mammalian Sperm by a Non-Receptor-Mediated Mechanism. **Biology of Reproduction**, 77, 2007. 960–969.
- SELVAM, M. K. P. et al. Proteomics and metabolomics — Current and future perspectives in clinical andrology. **Andrologia**, 53(2), 2020. 1-18.
- SELVARAJU, S. et al. Current status of sperm functional genomics and its diagnostic potential of fertility in bovine (*Bos taurus*). **Systems biology in reproductive medicine**, 64(6), 2018. 484-501.
- SHAH, N. et al. Effect of reduced glutathione supplementation in semen extender on tyrosine phosphorylation and apoptosis like changes in frozen thawed Haryana bull spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, 182, 2017. 111-122.
- SHAN, S. et al. Sperm Lipid Markers of Male Fertility in Mammals. **Int. J. Mol. Sci.**, 22, 2021. 8767.

- SHAN, S. W. et al. Association of alpha/beta-Hydrolase D16B with Bovine Conception Rate and Sperm Plasma Membrane Lipid Composition. **J. Mol. Sci. Int.**, 21, 2020. 627.
- SHARAFI, M. et al. Pre-conditioning with xanthine oxidase to improve post thawed quality of bull sperm. **Cryobiology**, 89, 2019. 1-5.
- SHOJAEI, H. et al. Moribund sperm in frozen-thawed semen, and sperm motion end points post-thaw and post-swim-up, are related to fertility in Holstein AI bulls. **Theriogenology**, 77, 2012. 940-951.
- SIMÕES, R. et al. Influence of bovine sperm DNA fragmentation and oxidative stress on early embryo in vitro development outcome. **Reproduction**, 146(5), 2013. 433-441.
- SINGH, R. P. et al. Effect of sphingosine-1-phosphate on cryopreserved sheep testicular explants cultured in vitro. **Theriogenology**, 128, 2019. 184-192.
- SLIMEN, I. B. et al. Heat stress effects on livestock: molecular, cellular and metabolic aspects, a review. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, 100(3), 2016. 401-412.
- SUGKRAROEK, P. et al. Levels of cholesterol and phospholipids in freshly ejaculated sperm and Percoll-gradient-pelleted sperm from fertile and unexplained infertile men. **Fertil Steril**, 55, 1991. 820–827.
- TAKAHASHI, T. et al. N, N-Dimethylglycine decreases oxidative stress and improves in vitro development of bovine embryos. **The Journal of reproduction and development**, 62(2), 2016. 209–212.
- TANG, M. et al. The role of mitochondrial aconitate (ACO2) in human sperm motility. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, 60(5), 2014. 251-256.
- TORRES, M. A. et al. Metabolomic signature of spermatozoa established during holding time is responsible for differences in boar sperm freezability. **Biology of Reproduction**, ioab200, 2021.
- TRAORÉ, S. A. et al. Production objectives, trait and breed preferences of farmers keeping N'Dama, Fulani Zebu and crossbred cattle and implications for breeding programs. **Animal**, 11(4), 2017. 687-695.
- TRAVIS, A. J.; KOPF, G. S. The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. **J Clin Invest.**, 110(6), 2002. 731–736.
- TUNCERA, P. B. et al. Effect of glutamine and sugars after bull spermatozoa cryopreservation. **Theriogenology**, 75, 2011. 1459–1465.
- UGUR, M. R. et al. Advances in Cryopreservation of Bull Sperm. **Front. Vet. Sci.**, 27, 2019.
- UGUR, M. R. et al. Amino Acids of Seminal Plasma Associated With Freezability of Bull Sperm. **Frontiers in cell and developmental biology**, 7, 2020. 347.
- UMEHARA, T. et al. Methyl-beta cyclodextrin and creatine work synergistically under hypoxic conditions to improve the fertilization ability of boar ejaculated sperm. **Anim Sci J.**, 91(1), 2020. e13493.
- UNDERWOOD, S. L. et al. In vitro characteristics of frozen-thawed, sex-sorted bull sperm after refreezing or incubation at 15 or 37 degrees C. **Theriogenology**, 72(7), 2009. 1001-8.
- UTT, M. D. Prediction of bull fertility. **Animal Reproduction Science**, 169, 2016. 37-44.

- VADNAIS, M. L. et al. Adenine Nucleotide Metabolism and a Role for AMP in Modulating Flagellar Waveforms in Mouse Sperm. **Biology of Reproduction**, 90(6), 2014. 1-14.
- VAQUER, C. C. et al. Ceramide induces a multicomponent intracellular calcium increase triggering the acrosome secretion in human sperm. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1867(7), 2020. 118704.
- VAZ, F. M.; WANDERS, R. J. A. Carnitine biosynthesis in mammals. **Biochem J**, 361, 2002. 417-29.
- VELHO, A. L. C. et al. Metabolomic markers of fertility in bull seminal plasma. **PLOS ONE**, 13(4), 2018. e0195279.
- VERNET, P.; AITKEN, R. J.; DREVET, J. R. Antioxidant strategies in the epididymis. **Mol Cell Endocrinol**, 216, 2004. 31-39.
- VIJAYARAGHAVAN, S.; HOSKINS, D. D. Regulation of bovine sperm motility and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate by adenosine and its analogues. **Biology of Reproduction**, 34, 1986. 468-477.
- VOGEL, M. M. et al. Concurrent 2018 Hot Extremes Across Northern Hemisphere Due to Human-Induced Climate Change. **Earths Future**, 7, 2019. 692-703.
- WALCZAK-JEDRZEJOWSKA, R.; WOLSKI, J. K.; SLOWIKOWSKA-HILCZER, J. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. **Central European journal of urology**, 66(1), 2013. 60-67.
- WANG, C.; SWERDLOFF, R. S. Limitations of Semen Analysis as a Test of Male Fertility and Anticipated Needs from Newer Tests. **Fertil Steril**, 102(6), 2014. 1502-1507.
- WASSALL, S. R.; STILLWELL, W. Polyunsaturated fatty acid cholesterol interactions: domain formation in membranes. **Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes**, 1788(1), 2009. 24-32.
- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen, 60-61, 2000. 481-492.
- WILLIPINSKI-STAPELFELDT, B. et al. Comparative analysis between cyclic GMP and cyclic AMP signalling in human sperm. **Molecular Human Reproduction**, 10(7), 2004. 543-552.
- WOJTCZAK, L.; SLYSHENKOV, V. S. Protection by pantothenic acid against apoptosis and cell damage by oxygen free radicals - The role of glutathione. **BioFactors**, 17, 2003. 61-73.
- WOOD, P. L. et al. Lipidomics of equine sperm and seminal plasma: Identification of amphiphilic (O-acyl)- $\omega$ -hydroxy-fatty acids, 86, 2016. 1212-1221.
- WU, H. et al. Platelet-activating factor induces acrosome reaction via the activation of extracellular signal-regulated kinase in human spermatozoa. **Andrologia**, 52(5), 2020. e13565.
- XIA, J.; WISHART, D. S. Using MetaboAnalyst 3.0 for Comprehensive Metabolomics Data Analysis. **Current Protocols in Bioinformatics**, 55, 2016.
- YANG, K. et al. Effect of L-carnitine on sperm quality during liquid storage of boar semen. **Asian-Australas J Anim Sci.**, 33(11), 2020. 1763-1769.
- YEN, C. et al. Loss of flavin adenine dinucleotide (FAD) impairs sperm function and male reproductive advantage in *C. elegans*. **eLife - Cell biology**, 9, 2020. e52899.
- YI, Y. J. et al. Identification of the inorganic pyrophosphate metabolizing, ATP substituting pathway in mammalian spermatozoa. **PLOS ONE**, 7(4), 2012. e34524.
- ZEISEL, S. H.; DA COSTA, K.-A. Choline: an essential nutrient for public health. **Nutrition Reviews**, 67(11), 2009. 615-623.

ZHANG, H. et al. L-amino acid oxidase 1 in sperm is associated with reproductive performance in male mice and bulls. **Biology of Reproduction**, 104(5), 2021. 1154-1161.

ZHANG, J. et al. Urinary metabolome identifies signatures of oligozoospermic infertile men. **Fertil Steril.**, 102(1), 2014. 44-53.

ZHANG, X.; CUI, Y. D. L. S. M. Z. Y. The efficacy of combined l-carnitine and l-acetyl carnitine in men with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia: A systematic review and meta-analysis. **Andrologia**, 52, 2020. e13470.

ZHANG, Y. et al. Metabolomic analysis and identification of sperm freezability-related metabolites in boar seminal plasma. **Animals**, 11(7), 2021. 1939.

ZHAO, K. et al. Metabolomic Profiling of Human Spermatozoa in Idiopathic Asthenozoospermia Patients Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **BioMed Research International**, 2018, 2018. 8327506.

ZOU, Y. et al. Acetyl-L-carnitine: An Effective Antioxidant against Cryo-damage on Human Spermatozoa with Asthenospermia. **Huazhong Univ Sci Technol**, 37(6), 2017. 915-921.

## APÊNDICES

### APÊNDICE 1 - QUADROS DE CORRELAÇÃO DO EXPERIMENTO 1.1

Análises de correlação dos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade com dados das análises funcionais, apresentando apenas variáveis com maior importância nas diferenças encontradas entre os grupos.

Quadro1 - Correlação de variáveis funcionais no grupo Angus de alta fertilidade ( $n=40$ )

DAB Classe I	IAM 0,910 <,0001	Across. íntegro 0,693 <,0001	Defeitos menores -0,633 <,0001	MP íntegra 0,599 <,0001	DAB Classe II -0,588 <,0001	PMM alto 0,550 0,0002	S. frag. DNA -0,520 0,0006	PMM baixo -0,507 0,0009				
DAB Classe II	DAB Classe I -0,588 <,0001	EROs -0,373 0,0212	PMM alto -0,369 0,019	Defeitos menores 0,314 0,0488								
DAB Classe III	IAM -0,609 <,0001	Across. íntegro -0,586 <,0001	MP íntegra -0,516 0,0007	Defeitos totais 0,491 0,0013	DAB Classe I -0,480 0,0017	DAB Classe IV 0,427 0,006	PMM alto -0,414 0,0079	Defeitos menores 0,402 0,0101	TBARS 0,399 0,0108	PMM baixo 0,389 0,0131	Defeitos maiores 0,350 0,0271	
DAB Classe IV	IAM -0,74199 <,0001	DAB Classe I -0,46749 0,0024	Across. íntegro -0,4391 0,0046	S. frag. DNA 0,41242 0,0082	Defeitos totais 0,38544 0,014	MP íntegra -0,36481 0,0206						
Índice de Atividade mitocondrial (IAM)	DAB Classe I 0,910 <,0001	DAB Classe IV -0,742 <,0001	Across. íntegro 0,716 <,0001	MP íntegra 0,613 <,0001	Defeitos menores -0,599 <,0001	Defeitos totais -0,560 0,0002	S. frag. DNA -0,549 0,0002	PMM alto 0,484 0,0015	PMM baixo -0,447 0,0038			
PMM alto	PMM baixo -0,777 <,0001	DAB Classe I 0,550 0,0002	Across. íntegro 0,516 0,0007	IAM 0,484 0,0015	Defeitos menores -0,478 0,0018	DAB Classe III -0,414 0,0079	S. frag. DNA -0,404 0,0098	Defeitos totais -0,376 0,0167	PMM médio 0,363 0,0212	MP íntegra 0,313 0,049		
PMM médio	PMM baixo -0,841 <,0001	PMM alto 0,363 0,0212	LIN -0,355 0,0246	BCF -0,335 0,0345	ALH 0,309 0,052							
PMM baixo	PMM médio -0,841 <,0001	PMM alto -0,777 <,0001	DAB Classe I -0,507 0,0009	Across. íntegro -0,476 0,0019	IAM -0,447 0,0038	Defeitos menores 0,400 0,0106	DAB Classe III 0,389 0,0131	S. frag. DNA 0,358 0,0233	Defeitos totais 0,353 0,0255	MP íntegra -0,340 0,0317		
TBARS	Defeitos totais 0,484 0,0015	DAB Classe III 0,399 0,0108	Defeitos maiores 0,361 0,0223	Defeitos menores 0,357 0,0239	Across. íntegro -0,350 0,0269							
EROs	Motil. total -0,385 0,017	SPTZ estáticos 0,381 0,0184	DAB Classe II -0,373 0,0212									
Acrossoma Íntegro (Across. Íntegro)	IAM 0,716 <,0001	DAB Classe I 0,693 <,0001	MP íntegra 0,648 <,0001	Defeitos totais -0,647 <,0001	DAB Classe III -0,586 <,0001	PMM alto 0,516 0,0007	Defeitos menores -0,476 0,0019	PMM baixo -0,476 0,0019	S. frag. DNA -0,465 0,0025	Defeitos maiores -0,425 0,0063	TBARS -0,350 0,0269	
Membrana plasmática íntegra (MP íntegra)	Across. íntegro 0,648 <,0001	IAM 0,613 <,0001	DAB Classe I 0,599 <,0001	S. frag. DNA -0,577 <,0001	DAB Classe III -0,516 0,0007	Defeitos menores -0,404 0,0097	Defeitos totais -0,386 0,0138	DAB Classe IV -0,365 0,0206	PMM baixo -0,340 0,0317	PMM alto 0,313 0,049		
Susceptibilidade à fragmentação de DNA (S. frag. DNA)	MP íntegra -0,577 <,0001	IAM -0,549 0,0002	DAB Classe I -0,520 0,0006	Across. íntegro -0,465 0,0025	DAB Classe IV 0,412 0,0082	PMM alto -0,404 0,0098	PMM baixo 0,358 0,0233					

Fonte: Leite (2022)

Correlação com dados não transformados pelo teste de Spearman com ranqueamento. Correlações inversas são apresentadas em quadros vermelhos e correlações positivas azuis. A primeira linha abaixo do nome da variável é o valor de  $r$  e a segunda linha o valor de  $P$ .

Quadro 2 - Correlação de variáveis funcionais no grupo Angus de baixa fertilidade (n=40)

DAB Classe I	IAM 0,907 <,0001	DAB Classe II -0,635 <,0001	PMM baixo 0,546 0,0003	MP íntegra 0,516 0,0007	PMM médio 0,490 0,0013	DAB Classe III -0,474 0,002	Motil. total 0,410 0,0087	Across. Íntegro 0,326 0,0404		
DAB Classe II	DAB Classe I -0,635 <,0001	Motil. total -0,555 0,0002	Motil. progress -0,425 0,0063	IAM -0,354 0,0248	DAB Classe IV -0,354 0,0251	PMM baixo 0,349 0,0271	EROs 0,334 0,0378			
DAB Classe III	IAM -0,538 0,0003	PMM médio -0,487 0,0014	DAB Classe I -0,474 0,002	LIN -0,460 0,0028	Across. Íntegro -0,422 0,0067	MP íntegra -0,403 0,01				
DAB Classe IV	Across. Íntegro -0,515 0,0007	IAM -0,421 0,0068	MP íntegra -0,395 0,0116	TBARS -0,377 0,0179	S. frag. DNA -0,374 0,0175	DAB Classe II -0,354 0,0251	EROs -0,345 0,0313			
Índice de atividade mitocondrial (IAM)	DAB Classe I 0,907 <,0001	MP íntegra 0,611 <,0001	DAB Classe III -0,538 0,0003	PMM baixo 0,467 0,0024	PMM médio 0,463 0,0027	Across. Íntegro 0,458 0,0029	S. frag. DNA -0,447 0,0038	DAB Classe IV -0,421 0,0068	TBARS 0,394 0,0131	
PMM alto	PMM baixo -0,699 <,0001									
PMM médio	PMM baixo -0,739 <,0001	Across. Íntegro 0,682 <,0001	MP íntegra 0,625 <,0001	LIN -0,539 0,0003	DAB Classe I 0,490 0,0013	DAB Classe III -0,487 0,0014	IAM 0,463 0,0027	Defeitos menores 0,397 0,0112		
PMM baixo	PMM médio -0,739 <,0001	PMM alto -0,699 <,0001	DAB Classe I 0,546 0,0003	MP íntegra -0,537 0,0004	IAM 0,467 0,0024	DAB Classe II 0,349 0,0271				
TBARS	S. frag. DNA 0,634 <,0001	Defeitos maiores 0,586 <,0001	Defeitos totais 0,469 0,0026	Across. Íntegro -0,466 0,0028	MP íntegra -0,446 0,0045	IAM 0,394 0,0131	DAB Classe IV -0,377 0,0179			
EROs	Motil. progress -0,543 0,0004	Motilidade total -0,494 0,0014	DAB Classe IV -0,345 0,0313	DAB Classe II 0,334 0,0378	MP íntegra -0,329 0,0405					
Acrossoma Íntegro (Across Íntegro)	PMM médio 0,682 <,0001	MP íntegra 0,628 <,0001	LIN 0,523 0,0005	DAB Classe IV -0,515 0,0007	TBARS -0,466 0,0028	IAM 0,458 0,0029	DAB Classe III -0,422 0,0067	S. frag. DNA -0,350 0,0268	DAB Classe I 0,326 0,0404	
Membrana plasmática íntegra (MP íntegra)	Across. Íntegro 0,628 <,0001	PMM médio 0,625 <,0001	IAM 0,611 <,0001	PMM baixo -0,537 0,0004	DAB Classe I 0,516 0,0007	S. frag. DNA -0,504 0,0009	DAB Classe III -0,403 0,01	DAB Classe IV -0,395 0,0116	Motil. total 0,333 0,0357	EROs -0,329 0,0405
Susceptibilidade à fragmentação de DNA (S. frag. DNA)	TBARS 0,634 <,0001	MP íntegra -0,504 0,0009	IAM -0,447 0,0038	DAB Classe IV -0,374 0,0175	Across. Íntegro -0,350 0,0268	Defeitos maiores 0,335 0,0345	Motil. progress -0,329 0,0385	Defeitos totais 0,323 0,0423		
ALH	LIN -0,721 <,0001	STR -0,694 <,0001	BCF -0,359 0,023							
BCF	STR 0,618 <,0001	LIN 0,607 <,0001	ALH -0,359 0,023	PMM médio 0,356 0,0489						
LIN	STR 0,910 <,0001	ALH -0,721 <,0001	BCF 0,607 <,0001	PMM médio 0,539 0,0003	Across. Íntegro 0,523 0,0005	DAB Classe III -0,460 0,0028				

Fonte: Leite (2022)

Correlação com dados não transformados pelo teste de Spearman com ranqueamento. Correlações inversas são apresentadas em quadros vermelhos e correlações positivas azuis. A primeira linha abaixo do nome da variável é o valor de r e a segunda linha o valor de P.



Quadro 3 - Correlação de variáveis funcionais no grupo Nelore de alta fertilidade (n=44)

DAB Classe I	IAM 0,967 <,0001	DAB Classe IV -0,717 <,0001	DAB Classe II -0,705 <,0001	DAB Classe III -0,599 <,0001	Across. Íntegro 0,450 0,0028	Defeitos maiores -0,446 0,0031	MP íntegra 0,374 0,0146	Motil. total 0,317 0,041		
DAB Classe II	DAB Classe I -0,705 <,0001	IAM -0,539 0,0002	Defeitos totais -0,333 0,0311	Defeitos maiores -0,306 0,0484						
DAB Classe III	DAB Classe I -0,599 <,0001	IAM -0,596 <,0001	S. frag. DNA 0,541 0,0002	Defeitos maiores 0,451 0,0028	Motil. total -0,440 0,0036	Across. Íntegro -0,407 0,0074				
DAB Classe IV	IAM -0,831 <,0001	DAB Classe I -0,717 <,0001	Across. Íntegro -0,455 0,0025	MP íntegra -0,453 0,0026	Motil. progress -0,320 0,039					
Índice de atividade mitocondrial (IAM)	DAB Classe I 0,967 <,0001	DAB Classe IV -0,831 <,0001	DAB Classe III -0,596 <,0001	DAB Classe II -0,539 0,0002	Across. Íntegro 0,507 0,0006	MP íntegra 0,428 0,0047	Defeito maiores -0,407 0,0075	Motil. total 0,339 0,0279	Motil. progress 0,333 0,0313	S. frag. DNA -0,320 0,0391
PMM alto	PMM baixo -0,863 <,0001	LIN 0,343 0,0225								
PMM médio	PMM baixo -0,559 <,0001	Defeitos totais 0,446 0,0024	Defeitos maiores 0,403 0,0067	Defeitos menores 0,302 0,0467						
PMM baixo	PMM alto -0,863 <,0001	PMM médio -0,559 <,0001	Defeitos maiores 0,476 0,0011	Defeitos totais 0,457 0,0018	Defeitos menores 0,314 0,038					
EROs	Across. Íntegro -0,529 0,0002	S. frag. DNA 0,364 0,015								
Acrossoma Íntegro (Across Íntegro)	Motil. progress 0,725 <,0001	MP íntegra 0,702 <,0001	Motil. total 0,699 <,0001	S. frag. DNA -0,663 <,0001	EROs -0,529 0,0002	SPTZ Estáticos -0,519 0,0003	IAM 0,507 0,0006	DAB Classe IV -0,455 0,0025	DAB Classe I 0,450 0,0028	
Membrana plasmática íntegra (MP íntegra)	Motil. progress 0,817 <,0001	Motil. total 0,811 <,0001	Across. Íntegro 0,702 <,0001	SPTZ Estáticos -0,687 <,0001	DAB Classe IV -0,453 0,0026	S. frag. DNA -0,453 0,002	IAM 0,428 0,0047	DAB Classe I 0,374 0,0146		
Susceptibilidade à fragmentação de DNA (S. frag. DNA))	Motil. total -0,714 <,0001	Across. Íntegro -0,663 <,0001	Motil. progress -0,635 <,0001	DAB Classe III 0,541 0,0002	MP íntegra -0,453 0,002	SPTZ Estáticos 0,445 0,0025	EROs 0,364 0,015	IAM -0,320 0,0391		

Fonte: Leite (2022)

Correlação com dados não transformados pelo teste de Spearman com ranqueamento. Correlações inversas são apresentadas em quadros vermelhos e correlações positivas azuis. A primeira linha abaixo do nome da variável é o valor de *r* e a segunda linha o valor de *P*.

Quadro 4 - Correlação de variáveis funcionais no grupo Nelore de baixa fertilidade ( $n=28$ )

DAB Classe I	IAM 0,956 <,0001	DAB Classe II -0,793 <,0001	DAB Classe III -0,757 <,0001	Across. Íntegro 0,483 0,0124	DAB Classe IV -0,467 0,014	S. frag. DNA -0,459 0,0159	PMM alto -0,449 0,0187	PMM médio 0,449 0,0188	
DAB Classe II	DAB Classe I -0,793 <,0001	IAM -0,629 0,0004	PMM alto 0,547 0,0031	DAB Classe III 0,485 0,0103	PMM médio -0,422 0,0282				
DAB Classe III	DAB Classe I -0,757 <,0001	IAM -0,757 <,0001	PMM médio -0,486 0,0101	DAB Classe II 0,485 0,0103	PMM baixo 0,427 0,0263	S. frag. DNA 0,405 0,0362			
DAB Classe IV	IAM -0,674 0,0001	DAB Classe I -0,467 0,014	S. frag. DNA 0,432 0,0246						
Índice de atividade mitocondrial (IAM)	DAB Classe I 0,956 <,0001	DAB Classe III -0,757 <,0001	DAB Classe IV -0,674 0,0001	DAB Classe II -0,629 0,0004	S. frag. DNA -0,509 0,0067	Across. Íntegro 0,458 0,0187	PMM médio 0,439 0,0218	PMM alto -0,392 0,0434	
PMM alto	TBARS -0,606 0,0006	DAB Classe II 0,547 0,0031	PMM baixo -0,539 0,0031	DAB Classe I -0,449 0,0187	PMM médio -0,437 0,02	IAM -0,392 0,0434			
PMM médio	DAB Classe III -0,486 0,0101	PMM baixo -0,464 0,0129	DAB Classe I 0,449 0,0188	IAM 0,439 0,0218	PMM alto -0,437 0,02	DAB Classe II -0,422 0,0282	Defeitos menores -0,385 0,0428	Defeitos totais -0,382 0,0451	
PMM baixo	PMM alto -0,539 0,0031	PMM médio -0,464 0,0129	DAB Classe III 0,427 0,0263						
TBARS	PMM alto -0,606 0,0006	S. frag. DNA 0,560 0,002							
Acrossoma Íntegro (Across Íntegro)	MP íntegra 0,662 0,0002	DAB Classe I 0,483 0,0124	IAM 0,458 0,0187	SPTZ Estáticos -0,444 0,0202	Motil. progress 0,420 0,0294				
Membrana plasmática íntegra (MP íntegra)	Across. Íntegro 0,662 0,0002	SPTZ Estáticos -0,535 0,004	Motil. total 0,508 0,0068	Motil. progress 0,489 0,0097					
Susceptibilidade à fragmentação de DNA (S. frag. DNA)	TBARS 0,560 0,002	Motil. total -0,529 0,0038	IAM -0,509 0,0067	DAB Classe I -0,459 0,0159	Motil. progress -0,446 0,0173	Defeitos totais 0,437 0,0201	DAB Classe IV 0,432 0,0246	SPTZ Estáticos 0,431 0,0222	DAB Classe III 0,405 0,0362

Fonte: Leite (2022)

Correlação com dados não transformados pelo teste de Spearman com ranqueamento. Correlações inversas são apresentadas em quadros vermelhos e correlações positivas azuis. A primeira linha abaixo do nome da variável é o valor de  $r$  e a segunda linha o valor de  $P$ .

## APÊNDICE 2 - *LOADINGS* DAS ANÁLISES DE PCA E VIP SCORES DE PLS-DA DO EXPERIMENTO 1.1

As tabelas abaixo apresentam *loadings* das análises de PCA e *VIP scores* de PLS-DA, analisados pelo sistema em R do MetaboAnalyst 5.0 (XIA e WISHART, 2016; PANG, CHONG, *et al.*, 2021). As mesmas se referem aos dados das análises funcionais e são divididas conforme a comparação realizada entre os grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade. *Loadings* positivos indicam que uma variável e um componente principal estão positivamente correlacionados: um aumento em um resulta em um aumento no outro. *Loadings* negativos indicam uma correlação inversa. *Loadings* maiores (positivos ou negativos) indicam que uma variável tem um forte efeito naquele componente principal. Nas legendas sob as tabelas de *loadings* de PCA são apresentadas as porcentagens de resposta de variância dos cinco componentes principais.

Tabela 67 - *Loadings* de PCA para as variáveis funcionais dos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade

Variáveis	<i>Loadings</i> Componente 1	<i>Loadings</i> Componente 2
Suscetibilidade a danos de DNA	0,856	0,387
Suscetibilidade à peroxidação lipídica (TBARS)	-0,130	0,475
Presença de EROs	-0,176	0,413
Integridade de membrana plasmática	-0,061	-0,072
Atividade mitocondrial alta - DAB Classe I	-0,092	-0,076
Atividade mitocondrial média - DAB Classe II	-0,454	0,407
Índice de atividade mitocondrial	-0,065	-0,053
Potencial de membrana mitocondrial alto	0,040	-0,453
Potencial de membrana mitocondrial médio	-0,028	0,131
Potencial de membrana mitocondrial baixo	0,030	0,170
Defeitos maiores	-0,023	0,177
Amplitude do movimento lateral da cabeça (ALH)	0,038	0,036
Linearidade (LIN)	-0,011	-0,040

Fonte: Leite (2022)

Na tabela são apresentados os *loadings* dos componentes 1 e 2, com a variância dos componentes 1 a 5 equivalendo a 60,28%, 14,61%, 8,51%, 7,60% e 4,0%, respectivamente.

Tabela 68 - *VIP scores* para as variáveis funcionais dos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade

Variáveis	PLS-DA <i>VIP scores</i>
Suscetibilidade a danos de DNA (%)	3,687
Suscetibilidade à peroxidação lipídica (TBARS)	1,692
Presença de EROs	1,548
Atividade mitocondrial média - DAB Classe II	0,784
Integridade de membrana plasmática	0,549
Atividade mitocondrial alta - DAB Classe I	0,456
Índice de atividade mitocondrial	0,428
Potencial de membrana mitocondrial alto	0,426
Amplitude do movimento lateral da cabeça (ALH)	0,367
Potencial de membrana mitocondrial baixo	0,332
Linearidade (LIN)	0,260
Potencial de membrana mitocondrial médio	0,232

Variáveis	PLS-DA VIP scores
Defeitos maiores	0,209
Atividade mitocondrial baixa - DAB Classe III	0,151
Integridade de membrana acrossomal	0,130

Fonte: Leite (2022)

Tabela 69 - *Loadings* de PCA para as variáveis funcionais dos grupos Angus de alta e baixa fertilidade

Variáveis	<i>Loadings</i> Componente 1	<i>Loadings</i> Componente 2
Suscetibilidade a danos de DNA (%)	0,682	0,073
Suscetibilidade à peroxidação lipídica (TBARS)	0,355	0,489
Presença de EROs	0,273	0,108
Integridade de membrana plasmática	-0,049	0,661
Atividade mitocondrial média - DAB Classe II	-0,028	0,369
Atividade mitocondrial alta - DAB Classe I	0,203	0,227
Índice de atividade mitocondrial	0,172	0,167
Potencial de membrana mitocondrial alto	-0,467	0,348
Potencial de membrana mitocondrial médio	0,151	0,316
Potencial de membrana mitocondrial baixo	0,187	-0,262
Defeitos maiores	0,221	-0,064
Amplitude do movimento lateral da cabeça (ALH)	0,081	-0,126
Linearidade (LIN)	-0,106	0,100

Fonte: Leite (2022)

Na tabela são apresentados os *loadings* dos componentes 1 e 2, com a variância dos componentes 1 a 5 equivalendo a 57,03%, 16,41%, 8,0%, 7,4% e 6,37%, respectivamente.

Tabela 70 - *VIP scores* para as variáveis funcionais dos grupos Angus de alta e baixa fertilidade

Variáveis	PLS-DA VIP scores
Suscetibilidade a danos de DNA (%)	2,478
Potencial de membrana mitocondrial alto	2,217
Suscetibilidade à peroxidação lipídica (TBARS)	1,553
Defeitos maiores	1,034
Presença de EROs	0,762
Potencial de membrana mitocondrial baixo	0,756
Potencial de membrana mitocondrial médio	0,705
Integridade de membrana plasmática	0,473
Amplitude do movimento lateral da cabeça (ALH)	0,377
Atividade mitocondrial média - DAB Classe II	0,351
Índice de atividade mitocondrial	0,306
Linearidade (LIN)	0,301
Atividade mitocondrial alta - DAB Classe I	0,251
Integridade de membrana acrossomal	0,121
Atividade mitocondrial baixa - DAB Classe III	0,093

Fonte: Leite (2022)

Tabela 71 - *Loadings* de PCA para as variáveis funcionais dos grupos Nelore de alta e baixa fertilidade

<b>Variáveis</b>	<b>Loadings Componente 1</b>	<b>Loadings Componente 2</b>
Atividade mitocondrial alta - DAB Classe I	0,189	0,176
Atividade mitocondrial média - DAB Classe II	-0,137	-0,127
Atividade mitocondrial baixa - DAB Classe III	-0,472	0,174
Índice de atividade mitocondrial	0,073	0,085
Defeitos maiores	-0,144	0,078
Suscetibilidade à peroxidação lipídica (TBARS)	0,694	0,093
Integridade de membrana acrossomal	0,110	0,132
Integridade de membrana plasmática	0,210	0,072
Presença de EROs	-0,102	0,915
Potencial de membrana mitocondrial alto	0,068	-0,111
Potencial de membrana mitocondrial médio	-0,001	0,122
Suscetibilidade a danos de DNA (%)	-0,380	-0,115

Fonte: Leite (2022)

Na tabela são apresentados os *loadings* dos componentes 1 e 2, com a variância dos componentes 1 a 5 equivalendo a 38,26%, 23,85%, 11,68%, 9,4% e 7,35%, respectivamente.

Tabela 72 - *VIP scores* para as variáveis funcionais dos grupos Nelore de alta e baixa fertilidade

<b>Variáveis</b>	<b>PLS-DA <i>VIP scores</i></b>
Suscetibilidade à peroxidação lipídica (TBARS)	3,039
Defeitos maiores	1,213
Integridade de membrana plasmática	1,076
Suscetibilidade a danos de DNA (%)	1,073
Atividade mitocondrial média - DAB Classe II	1,036
Potencial de membrana mitocondrial alto	0,843
Atividade mitocondrial alta - DAB Classe I	0,691
Atividade mitocondrial baixa - DAB Classe III	0,641
Presença de EROs	0,576
Índice de atividade mitocondrial	0,529
Integridade de membrana acrossomal	0,519
Potencial de membrana mitocondrial médio	0,432
Potencial de membrana mitocondrial baixo	0,268
Linearidade (LIN)	0,055
Amplitude do movimento lateral da cabeça (ALH)	0,044

Fonte: Leite (2022)

### APÊNDICE 3 - *LOADINGS* DAS ANÁLISES DE PCA E PLS-DA DO EXPERIMENTO 1.2

As tabelas abaixo apresentam os *loadings* das análises de PCA e PLS-DA, analisados pelo sistema em R do MetaboAnalyst 5.0 (XIA e WISHART, 2016; PANG, CHONG, *et al.*, 2021). As mesmas se referem aos dados das análises de metabólitos e são divididas em classes e entre as comparações realizadas nos grupos Angus e Nelore de alta e baixa fertilidade. *Loadings* positivos indicam que uma variável e um componente principal estão positivamente correlacionados: um aumento em um resulta em um aumento no outro. *Loadings* negativos indicam uma correlação inversa. *Loadings* maiores (positivos ou negativos) indicam que uma variável tem um forte efeito naquele componente principal. Nas legendas sob as tabelas de *loadings* de PCA são apresentadas as porcentagens de resposta de variância dos cinco componentes principais.

#### Lipídios

Tabela 73 - *Loadings* de PCA e PLS-DA de lipídios dos grupos Angus e Nelore, alta e baixa fertilidade

PCA - Lipídios	<i>Loadings</i> 1	<i>Loadings</i> 2	PLS-DA - Lipídios	<i>Loadings</i> 1	<i>Loadings</i> 2
DHA	-0,011	0,293	PC(16:1(9Z)/16:1(9Z))	-0,515	0,0372
LPC(16:0/0:0)	0,215	-0,278	SM(d18:1/16:0)	-0,499	0,0784
LPC(18:1)	0,282	-0,357	PC(18:1(9Z)/18:0)	-0,457	0,265
LPC(18:0)	0,295	-0,173	PC(18:0/18:2(9Z,12Z))	-0,398	0,447
SM(d18:1/16:1)	0,152	0,454	LPC(16:0/0:0)	-0,293	-0,0671
SM(d18:1/16:0)	0,332	-0,050	PC(18:0/14:0)	-0,256	0,115
PC(16:1(9Z)/16:1(9Z))	0,508	-0,118	LPC(18:1)	-0,253	-0,0732
SM(d18:1/18:0)	0,218	0,190	LPC(18:0)	-0,227	0,069
PC(20:4/16:0)	0,221	0,611	SM(d18:1/24:0)	-0,154	0,161
PC(18:0/14:0)	0,256	-0,090	SM(d18:1/18:0)	-0,107	0,143
PC(18:0/18:2(9Z,12Z))	0,211	0,128	PC(17:0/17:0)	-0,010	0,0686
PC(17:0/17:0)	0,175	-0,023	PC(20:4/16:0)	-0,076	0,580
PC(18:1(9Z)/18:0)	0,330	0,038	PC(38:6)	-0,011	0,444
SM(d18:1/24:0)	0,224	0,149	SM(d18:1/16:1)	-0,0075	0,155
			Liso-PAF	0,0147	0,306
			DHA	0,0645	0,0817

Fonte: Leite (2022)

Na tabela são apresentados os *loadings* de PCA dos componentes 1 e 2, com a variância dos componentes 1 a 5 equivalendo a 59,94%, 23,05%, 4,84%, 2,76% e 1,86%, respectivamente.

Tabela 74 - *Loadings* de PCA e PLS-DA de lipídios dos grupos Angus de alta e baixa fertilidade

PCA - Lipídios	<i>Loadings</i> 1	<i>Loadings</i> 2	PLS-DA - Lipídios	<i>Loadings</i> 1	<i>Loadings</i> 2
Colesterol	-0,060	0,696	PC(20:4/16:0)	-0,272	-0,0930
Liso-PAF	0,097	0,487	LPC(18:0)	-0,271	-0,104
LPC(18:0)	0,224	-0,054	PC(18:1(9Z)/18:0)	-0,271	-0,156
PC(16:1(9Z)/16:1(9Z))	0,423	-0,283	SM(d18:1/24:0)	-0,270	-0,112
PC(16:0/14:0)	0,266	0,263	PC(16:1(9Z)/16:1(9Z))	-0,267	-0,146
SM(d18:1/18:0)	0,246	-0,032	PC(16:0/18:2(9Z,12Z))	-0,265	-0,217
PC(18:1(9Z)/14:0)	0,286	-0,132	SM(d18:1/16:0)	-0,262	-0,0814
PC(38:6)	0,172	0,238	PC(18:0/14:0)	-0,262	0,0051
PC(20:4/16:0)	0,396	0,052	SM(d18:1/18:0)	-0,261	-0,0784
PC(16:0/18:2(9Z,12Z))	0,436	-0,034	PC(38:6)	-0,244	0,293
PC(18:0/22:6)	0,172	0,155	PC(18:1(9Z)/14:0)	-0,243	0,0764
PC(18:1(9Z)/18:0)	0,319	-0,001	PC(18:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	-0,242	-0,0718
SM(d18:1/24:1(15Z))	0,190	0,152	LPC(16:0/0:0)	-0,239	0,159
			SM(d18:1/16:1)	-0,231	0,100
			PC(18:0/22:6)	-0,227	0,345
			Liso-PAF	-0,158	0,825

Fonte: Leite (2022)

Na tabela são apresentados os *loadings* de PCA dos componentes 1 e 2, com a variância dos componentes 1 a 5 equivalendo a 83,71%, 4,2%, 3,03%, 2,23% e 1,64%, respectivamente.

Tabela 75 - *Loadings* de PCA e PLS-DA de lipídios dos grupos Nelore de alta e baixa fertilidade

PCA - Lipídios	<i>Loadings</i> 1	<i>Loadings</i> 2	PLS-DA - Lipídios	<i>Loadings</i> 1	<i>Loadings</i> 2
Lyso-PAF C-16	0,281	0,157	PC(16:0/14:0)	-0,460	0,022
LPC(17:1(10Z)/0:0)	0,261	-0,460	LPC(17:1(10Z)/0:0)	-0,392	0,705
LPC(18:0)	0,283	0,136	SM(d18:1/16:0)	-0,388	0,171
SM(d18:1/16:1)	0,019	0,297	SM(d18:1/18:0)	-0,306	0,071
SM(d18:1/16:0)	0,458	-0,096	SM(d18:1/24:0)	-0,237	0,057
PC(16:1(9Z)/16:1(9Z))	0,472	-0,275	PC(17:0/17:0)	-0,206	0,078
SM(d18:1/18:0)	0,333	-0,134	SM(d18:1/24:1(15Z))	-0,201	0,155
PC(16:0/18:2(9Z,12Z))	0,043	0,400	LPC(18:0)	-0,130	0,198
PC(18:0/14:0)	0,283	0,272	Lyso-PAF C-16	-0,089	0,215
PC(18:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	0,067	0,343	PC(18:0/14:0)	-0,051	0,284
PC(18:0/18:2(9Z,12Z))	0,157	0,269	PC(18:1(9Z)/18:0)	0,021	0,361
PC(18:1(9Z)/18:0)	0,233	0,360	PC(18:0/18:2(9Z,12Z))	0,047	0,269
SM(d18:1/24:1(15Z))	0,254	0,025	PC(18:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	0,169	0,257
			PC(16:0/18:2(9Z,12Z))	0,198	0,324
			SM(d18:1/16:1)	0,394	0,297

Fonte: Leite (2022)

Na tabela são apresentados os *loadings* de PCA dos componentes 1 e 2, com a variância dos componentes 1 a 5 equivalendo a 38,11%, 28,42%, 8,63%, 6,52% e 5,54%, respectivamente.

## Carnitinas

Tabela 76 - *Loadings* de PCA e PLS-DA de carnitinas dos grupos Angus e Nelore de alta e baixa fertilidade

PCA - Carnitinas	Loadings 1	Loadings 2	PLS-DA - Carnitinas	Loadings 1	Loadings 2
Propionil-L-carnitina	0,007	0,374	Propionil-L-carnitina	0,173	-0,522
Butiril-L-carnitina	0,011	0,503	Butiril-L-Carnitina	0,069	-0,626
Octanoil-L-carnitina	0,304	0,227	Octanoil-L-Carnitina	0,508	-0,499
Lauroil-L-carnitina	0,277	0,398	Lauroil-L-Carnitina	0,393	-0,217
Tetradecanoilcarnitina	0,258	0,466	Tetradecanoilcarnitina	0,336	-0,251
Palmitoil-L-carnitina	0,494	-0,245	Palmitoil-L-Carnitina	0,609	0,435
Estearoil-L-carnitina	0,687	-0,257	Estearoil-L-Carnitina	0,715	0,458
Acetilcarnitina	-0,065	0,230	Acetilcarnitina	0,145	-0,302
L-carnitina	0,208	0,024	L-Carnitina	0,259	0,030

Fonte: Leite (2022)

Na tabela são apresentados os *loadings* de PCA dos componentes 1 e 2, com a variância dos componentes 1 a 5 equivalendo a 44,46%, 24,77%, 12,52%, 5,58% e 4,01%, respectivamente.

Tabela 77 - *Loadings* de PCA e PLS-DA de carnitinas dos grupos Angus de alta e baixa fertilidade

PCA - Carnitinas	Loadings 1	Loadings 2	PLS-DA - Carnitinas	Loadings 1	Loadings 2
Propionil-L-carnitina	-0,156	0,453	Estearoil-L-Carnitina	-0,725	0,087
Butiril-L-carnitina	-0,050	0,457	Palmitoil-L-Carnitina	-0,504	0,083
Octanoil-L-carnitina	0,183	0,428	Acetilcarnitina	0,241	0,190
Lauroil-L-carnitina	0,242	0,377	Propionil-L-carnitina	0,222	0,303
Tetradecanoilcarnitina	0,252	0,346	L-Carnitina	-0,206	0,104
Palmitoil-L-carnitina	0,493	-0,051	Tetradecanoilcarnitina	-0,204	0,364
Estearoil-L-carnitina	0,702	-0,120	Lauroil-L-Carnitina	-0,189	0,359
Acetilcarnitina	-0,191	0,347	Butiril-L-Carnitina	0,117	0,363
L-carnitina	0,213	0,061	Octanoil-L-Carnitina	-0,069	0,697

Fonte: Leite (2022)

Na tabela são apresentados os *loadings* de PCA dos componentes 1 e 2, com a variância dos componentes 1 a 5 equivalendo a 57,33%, 24,55%, 5,22%, 4,33% e 3,29%, respectivamente.

Tabela 78 - *Loadings* de PCA e PLS-DA de carnitinas dos grupos Nelore de alta e baixa fertilidade

PCA - Carnitinas	Loadings 1	Loadings 2	PLS-DA - Carnitinas	Loadings 1	Loadings 2
Propionil-L-carnitina	0,293	0,110	Palmitoil-L-Carnitina	-0,513	-0,089
Butiril-L-carnitina	0,301	0,235	Octanoil-L-Carnitina	-0,491	-0,037
Octanoil-L-carnitina	0,383	-0,283	Propionil-L-carnitina	-0,436	0,180
Lauroil-L-carnitina	0,441	0,284	Estearoil-L-Carnitina	-0,374	0,089
Tetradecanoilcarnitina	0,480	0,394	Butiril-L-Carnitina	-0,353	0,360
Palmitoil-L-carnitina	0,208	-0,244	L-Carnitina	-0,340	0,221
Estearoil-L-carnitina	0,418	-0,700	Lauroil-L-Carnitina	-0,317	0,495
Acetilcarnitina	0,107	0,256	Tetradecanoilcarnitina	-0,276	0,543
L-carnitina	0,154	0,046	Acetilcarnitina	0,087	0,557

Fonte: Leite (2022)

Na tabela são apresentados os *loadings* de PCA dos componentes 1 e 2, com a variância dos componentes 1 a 5 equivalendo a 47,62%, 19,33%, 12,92%, 6,96% e 4,71%, respectivamente.



## Peptídeos, aminoácidos e derivados

Tabela 79 - *Loadings* de PCA e PLS-DA de peptídeos, aminoácidos e derivados dos grupos Angus e Nelore de alta e baixa fertilidade

PCA – Peptídeos, aminoácidos e derivados	<i>Loadings</i> 1	<i>Loadings</i> 2	PLS-DA – Peptídeos, aminoácidos e derivados	<i>Loadings</i> 1	<i>Loadings</i> 3
Glutaciona	-0,251	0,135	Creatina	-0,682	0,263
Glutaciona oxidada	0,131	-0,122	Citrulina	-0,336	0,377
Ácido aspártico	0,059	0,208	Glutamina	-0,303	0,060
Alanina	0,202	0,152	Ácido glutâmico	-0,244	0,022
Treonina	0,058	0,238	Alanina	-0,192	0,131
Ácido glutâmico	0,224	0,161	Ácido aspártico	-0,088	0,053
Prolina	-0,129	0,269	Glutaciona oxidada	-0,046	0,168
Metionina	0,024	0,370	Treonina	-0,036	0,227
Tirosina	-0,007	0,407	Metionina	-0,031	0,237
Arginina	0,047	0,277	Arginina	0,003	0,295
Isoleucina	-0,073	0,253	Triptofano	0,018	0,399
Leucina	-0,027	0,341	Tirosina	0,059	0,423
Triptofano	0,047	0,359	Leucina	0,098	0,417
Citrulina	0,391	0,174	Isoleucina	0,110	0,282
Glutamina	0,294	0,077	Glutaciona	0,136	0,233
Creatina	0,745	-0,144	Serina	0,139	0,220
			Prolina	0,166	0,239
			Glicina	0,321	0,462
			Creatina	-0,682	0,263
			Citrulina	-0,336	0,377

Fonte: Leite (2022)

Na tabela são apresentados os *loadings* de PCA dos componentes 1 e 2, com a variância dos componentes 1 a 5 equivalendo a 40,53%, 28,47%, 9,57%, 4,6% e 3,43%, respectivamente.

Tabela 80 - *Loadings* de PCA e PLS-DA de peptídeos, aminoácidos e derivados dos grupos Angus de alta e baixa fertilidade

PCA – Peptídeos, aminoácidos e derivados	<i>Loadings</i> 1	<i>Loadings</i> 2	PLS-DA – Peptídeos, aminoácidos e derivados	<i>Loadings</i> 1	<i>Loadings</i> 3
Glutaciona	-0,144	0,373	Homocisteína	0,708	-0,414
Glutaciona oxidada	-0,265	0,316	Glicina	0,513	0,828
Ácido aspártico	0,277	-0,083	Metionina	-0,275	0,169
Ácido glutâmico	0,243	-0,046	Glutaciona oxidada	0,253	0,131
Prolina	0,263	0,094	Glutaciona	0,251	0,182
Metionina	0,453	-0,020	Ácido aspártico	-0,208	0,093
Tirosina	0,331	0,246	Creatina	0,205	0,065
Glicina	-0,225	0,218	Ácido glutâmico	-0,145	0,047
Arginina	0,248	0,291	Treonina	-0,122	0,173
Leucina	0,216	0,372	Tirosina	-0,113	0,330
Triptofano	0,272	0,399	Prolina	-0,113	0,204
Citrulina	0,088	0,272	Valina	-0,091	0,205
Creatina	-0,254	0,228	Isoleucina	-0,083	0,218
Homocisteína	-0,289	0,356	Fenilalanina	-0,054	0,250
			Arginina	-0,031	0,253
			Triptofano	-0,028	0,350
			Citrulina	0,008	0,167
			Leucina	0,003	0,315

Fonte: Leite (2022)

Na tabela são apresentados os *loadings* de PCA dos componentes 1 e 2, com a variância dos componentes 1 a 5 equivalendo a 42,93%, 23,27%, 9,44%, 5,84% e 3,98%, respectivamente.

Tabela 81 - *Loadings* de PCA e PLS-DA de peptídeos, aminoácidos e derivados dos grupos Nelore de alta e baixa fertilidade

PCA – Peptídeos, aminoácidos e derivados	Loadings 1	Loadings 2	PLS-DA – Peptídeos, aminoácidos e derivados	Loadings 1	Loadings 2
Glutaciona	0,060	0,396	Glutaciona	0,461	0,159
Glutaciona oxidada	-0,022	0,788	Isoleucina	0,383	-0,236
Ácido aspártico	0,161	-0,252	Valina	0,375	-0,243
Metionina	0,304	0,028	Glutaciona oxidada	0,349	0,124
Tirosina	0,422	0,203	Tirosina	0,326	-0,323
Isoleucina	0,238	0,097	Leucina	0,304	-0,329
Leucina	0,407	0,104	Triptofano	0,291	-0,333
Citrulina	0,466	-0,031	Dimetilglicina	0,258	-0,223
Glutamina	0,142	-0,272	Arginina	0,252	-0,291
Creatina	0,490	-0,149	Creatina	0,246	-0,165
			Citrulina	0,231	-0,283
			Metionina	0,229	-0,268
			Glutamina	-0,216	-0,275
			Ácido aspártico	-0,144	-0,310
			Ácido glutâmico	-0,096	-0,286

Fonte: Leite (2022)

Na tabela são apresentados os *loadings* de PCA dos componentes 1 e 2, com a variância dos componentes 1 a 5 equivalendo a 42,37%, 17,14%, 12,1%, 7,57% e 4,67%, respectivamente.

## Ácidos orgânicos

Tabela 82 - *Loadings* de PCA e PLS-DA de ácidos orgânicos dos grupos Angus e Nelore de alta e baixa fertilidade

PCA – Ácidos orgânicos	Loadings 1	Loadings 2	PLS-DA – Ácidos orgânicos	Loadings 1	Loadings 4
Ácido $\alpha$ -cetoglutárico	0,394	0,108	Ácido $\alpha$ -cetoglutárico	0,489	0,025
Ácido málico	0,314	0,076	Ácido málico	0,373	0,067
Ácido pirúvico	0,589	0,241	Ácido pirúvico	0,472	0,181
Ácido láctico	0,331	0,083	Ácido láctico	0,449	-0,262
Ácido succínico	0,072	0,206	Ácido succínico	0,189	0,612
Ácido $\gamma$ -aminobutírico	-0,360	0,261	Ácido $\gamma$ -aminobutírico	-0,342	0,585
Ácido adenilsuccínico	-0,274	0,506	Ácido adenilsuccínico	-0,101	0,298
Ácido pantotênico	0,212	0,036	Ácido pantotênico	0,144	-0,039
Ácido isocítrico	0,086	0,581	Ácido isocítrico	0,190	0,856
Ácido cítrico	-0,165	0,460	Ácido cítrico	-0,091	0,519

Fonte: Leite (2022)

Na tabela são apresentados os *loadings* de PCA dos componentes 1 e 2, com a variância dos componentes 1 a 5 equivalendo a 31,62%, 25,5%, 11,68%, 8,71% e 6,46%, respectivamente.

Tabela 83 - *Loadings* de PCA e PLS-DA de ácidos orgânicos dos grupos Angus de alta e baixa fertilidade

PCA – Ácidos orgânicos	Loadings 1	Loadings 2	PLS-DA – Ácidos orgânicos	Loadings 1	Loadings 3
Ácido $\alpha$ -cetoglutárico	-0,287	0,155	Ácido $\gamma$ -aminobutírico	-0,506	-0,307
Ácido pirúvico	-0,167	0,700	Ácido cítrico	-0,481	-0,086
Ácido láctico	-0,199	0,232	Ácido isocítrico	-0,381	-0,258
Ácido $\gamma$ -aminobutírico	0,528	0,081	Ácido adenilsuccínico	-0,324	-0,090
Ácido adenilsuccínico	0,331	-0,054	Ácido succínico	-0,136	0,026
Ácido pantotênico	-0,097	0,547	Ácido pantotênico	0,159	-0,482
Ácido isocítrico	0,399	0,230	Ácido pirúvico	0,190	-0,086
Ácido cítrico	0,542	0,266	Ácido láctico	0,223	-0,891
			Ácido málico	0,232	-0,395
			Ácido $\alpha$ -cetoglutárico	0,298	-0,227

Fonte: Leite (2022)

Na tabela são apresentados os *loadings* de PCA dos componentes 1 e 2, com a variância dos componentes 1 a 5 equivalendo a 43,22%, 23,31%, 11,5%, 8,99% e 5,55%, respectivamente.

Tabela 84 - *Loadings* de PCA e PLS-DA de ácidos orgânicos dos grupos Nelore de alta e baixa fertilidade

PCA – Ácidos orgânicos	Loadings 1	Loadings 2	PLS-DA – Ácidos orgânicos	Loadings 1	Loadings 4
Ácido $\alpha$ -cetoglutárico	-0,099	0,369	Ácido adenilsuccínico	-0,796	0,252
Ácido pirúvico	-0,379	0,183	Ácido pirúvico	0,394	0,226
Ácido láctico	-0,212	0,246	Ácido pantotênico	0,296	0,770
Ácido $\gamma$ -aminobutírico	0,203	0,197	Ácido $\gamma$ -aminobutírico	-0,222	0,246
Ácido adenilsuccínico	0,799	0,263	Ácido láctico	0,211	0,228
Ácido pantotênico	-0,284	0,637	Ácido cítrico	-0,178	0,428
Ácido isocítrico	0,107	0,445	Ácido isocítrico	-0,114	0,501
Ácido cítrico	0,170	0,241	Ácido $\alpha$ -cetoglutárico	0,107	0,226

Fonte: Leite (2022)

Na tabela são apresentados os *loadings* de PCA dos componentes 1 e 2, com a variância dos componentes 1 a 5 equivalendo a 46,76%, 25,74%, 9,22%, 6,41% e 4,8%, respectivamente.

## Nucleobases, nucleosídeos, nucleotídeos e demais metabólitos

Tabela 85 - *Loadings* de PCA e PLS-DA de demais metabólitos dos grupos Angus e Nelore de alta e baixa fertilidade

PCA - Demais Metabólitos	Loadings 1	Loadings 2	PLS-DA – Demais Metabólitos	Loadings 1	Loadings 4
Adenina	-0,112	0,343	Xantina	-0,649	0,795
Adenosina	-0,172	0,361	Colina	-0,512	-0,279
Guanosina	-0,004	0,258	Hipoxantina	-0,403	-0,071
Xantina	0,328	-0,138	FMN	0,347	-0,489
Hipoxantina	0,483	-0,188	AMP cíclico	0,279	0,057
Uridina	0,184	0,107	AMP	0,232	0,072
Inosina	0,012	0,323	Inosina	0,159	-0,065
FMN	0,039	0,216	Adenosina	0,139	0,069
AMP	-0,276	-0,148	Uridina	-0,116	-0,132
AMP cíclico	-0,305	0,193	Nicotinamida	-0,113	-0,175
GMP	-0,122	-0,072	Adenina	0,100	0,036
Colina	0,616	0,223	GMP	0,084	0,143
Nicotinamida	0,131	0,596	Guanosina	0,016	-0,024

Fonte: Leite (2022)

Na tabela são apresentados os *loadings* de PCA dos componentes 1 e 2, com a variância dos componentes 1 a 5 equivalendo a 31,12%, 22,51%, 14,6%, 6,64% e 5%, respectivamente

Tabela 86 - *Loadings* de PCA e PLS-DA de demais metabólitos dos grupos Angus de alta e baixa fertilidade

PCA – Demais Metabólitos	<i>Loadings</i> 1	<i>Loadings</i> 2	PLS-DA – Demais Metabólitos	<i>Loadings</i> 1	<i>Loadings</i> 3
Adenina	0,402	0,235	FMN	0,473	-0,507
Adenosina	0,461	0,183	Xantina	-0,409	-0,764
Guanosina	0,224	0,242	Inosina	0,387	0,075
Xantina	-0,271	0,264	AMP cíclico	0,338	0,089
Hipoxantina	-0,355	0,272	Hipoxantina	-0,319	-0,122
Inosina	0,239	0,163	Adenosina	0,304	-0,287
AMP	0,064	-0,699	Nicotinamida	0,272	-0,191
AMP cíclico	0,374	-0,187	Adenina	0,270	-0,332
Colina	-0,138	0,367	Colina	-0,185	-0,151
Nicotinamida	0,396	0,156	AMP	0,166	0,258
			Guanosina	0,135	-0,090
			CMP	0,072	0,024
			GMP	0,036	-0,060

Fonte: Leite (2022)

Na tabela são apresentados os *loadings* de PCA dos componentes 1 e 2, com a variância dos componentes 1 a 5 equivalendo a 42,86%, 23,67%, 9,73%, 6,19% e 4,62%, respectivamente

Tabela 87 - *Loadings* de PCA e PLS-DA de demais metabólitos dos grupos Nelore de alta e baixa fertilidade

PCA – Demais Metabólitos	<i>Loadings</i> 1	<i>Loadings</i> 2	PLS-DA – Demais Metabólitos	<i>Loadings</i> 1	<i>Loadings</i> 2
Xantina	0,371	-0,146	Xantina	-0,798	-0,403
Hipoxantina	0,522	-0,205	FMN	0,504	-0,893
Inosina	-0,179	0,156	Hipoxantina	-0,369	-0,409
FMN	0,259	0,465	Niacinamida	0,270	0,049
AMP	0,406	0,560	Colina	-0,227	-0,133
AMP cíclico	0,011	0,312	AMP cíclico	0,184	-0,090
GMP	0,257	0,275	TMP	0,183	-0,122
TMP	-0,226	0,201	Inosina	0,176	-0,018
Colina	0,296	-0,286	Adenosina	0,117	0,036
Nicotinamida	-0,347	0,296	Adenina	0,095	0,030
			AMP	0,086	-0,214
			Guanosina	0,069	-0,006
			CMP	-0,050	-0,126
			Uridina	0,049	-0,394
			GMP	-0,017	-0,115

Fonte: Leite (2022)

Na tabela são apresentados os *loadings* de PCA dos componentes 1 e 2, com a variância dos componentes 1 a 5 equivalendo a 32,67%, 27,61%, 11,32%, 9,13% e 6,30%, respectivamente

## APÊNDICE 4 – QUADROS DE CORRELAÇÃO DO CAPÍTULO 1

Os quadros abaixo são das análises de correlação realizadas nos grupos Angus e Nelore de alta e baixa fertilidade com os dados das análises funcionais e metabólicas. A correlação foi realizada apenas com variáveis funcionais que apresentaram maior importância nas diferenças encontradas em fertilidade e raça.

Quadro 5 - Correlação variáveis funcionais e metabólicas, Angus de alta fertilidade (n=40)

DAB Classe I	Homo cisteína 0,437 0,0123	Glicina -0,343 0,0736	Adenina 0,334 0,0353	Ác. Aspártico 0,328 0,0389	Ác. Adenil succínico 0,323 0,042	Glutamina 0,316 0,0473	PC 16:0/18:2 0,305 0,0483					
DAB Classe II	Ác. Glutâmico -0,474 0,002	Glutamina -0,422 0,0067	Homo cisteína -0,371 0,0365	Alanina -0,365 0,0205	SM d18:1/16:0 -0,324 0,0412	Citrulina -0,322 0,0431	Ác. Adenil succínico -0,315 0,0474	Adenosina -0,314 0,0482				
DAB Classe III	Ác. Glutâmico 0,462 0,0027	Creatina -0,393 0,0122	SM d18:1/16:0 0,376 0,0284	Metionina 0,375 0,0173	LPC 18:1 0,368 0,0194	Adenina -0,331 0,0372	GSSG -0,330 0,0378	Alanina 0,326 0,0404	PC 16:1(9Z) 0,318 0,0458			
DAB Classe IV	Ác. Glutâmico 0,464 0,0026	Glicina 0,453 0,0156	Ác. Pirúvico 0,367 0,0198	Creatina -0,333 0,0356								
Índice de atividade mitocondrial	Glicina -0,480 0,0097	PC 16:0/18:2 0,418 0,0154	Creatina 0,371 0,0186	Ác. Pirúvico -0,365 0,0205	Homo cisteína 0,355 0,0461	LPC 18:1 0,331 0,0371						
PMM Alto	Homo cisteína 0,659 <.0001	GSSG 0,402 0,0102	Citrulina 0,396 0,0115	AMP cíclico 0,377 0,0166	Ác. Isocítrico 0,361 0,0223	Glutamina 0,340 0,0316	GMP 0,321 0,0433	SM d18:1/16:0 0,314 0,0481	Estearoil carnitina 0,313 0,049			
PMM Médio	Acetil carnitina 0,501 0,001	Citrulina 0,493 0,0012	Adenosina 0,471 0,0022	Ác. Láctico 0,458 0,003	Estearoil carnitina 0,416 0,0077	Glutamina 0,408 0,0089	Ác. Adenil succínico 0,379 0,0159	DMG 0,363 0,0214	GSSG 0,332 0,0362			
PMM Baixo	Homo cisteína -0,603 0,0003	Citrulina -0,595 <.0001	Estearoil carnitina -0,510 0,0008	Glutamina -0,490 0,0013	Acetil carnitina -0,468 0,0023	GSSG -0,457 0,003	Ác. Adenil succínico -0,432 0,0053	DMG -0,403 0,0099	Adenosina -0,402 0,0102	Adenina -0,353 0,0253	Ác. Láctico -0,325 0,0409	
TBARS	Alanina 0,506 0,0009	Palmitoil carnitina -0,502 0,001	PC 16:1(9Z) 0,468 0,0023	GSSG -0,458 0,003	SM d18:1/18:0 0,418 0,0101	L Carnitina -0,384 0,0145	Metionina 0,362 0,0219	Ác. Láctico -0,344 0,0299	Colina -0,338 0,0331	Ác. Cítrico -0,337 0,0336	Estearoil carnitina -0,336 0,0339	
EROs	SMD 18:1/24:0 -0,430 0,01	LisoPAF -0,416 0,0094	L Carnitina 0,311 0,0476	Ác. Pirúvico 0,305 0,0428								
Acrossoma íntegro	Metionina -0,505 0,0009	PC 16:0/18:2 0,577 <.0001	Ác. Pirúvico -0,442 0,0043	GMP 0,442 0,0043	Homo cisteína 0,421 0,0164	Glutamina 0,390 0,0127	Propionil carnitina 0,387 0,0136	Estearoil carnitina 0,375 0,0171	Creatina 0,367 0,0199	Ác. Aspártico -0,359 0,0228	FMN -0,352 0,0481	
Membrana plasmática íntegra	Ác. Aspártico -0,654 <.0001	Adenina 0,599 <.0001	PC 16:0/18:2 0,564 0,0001	Adenosina 0,491 0,0013	Glicina -0,411 0,03	Propionil carnitina 0,371 0,0185	Ác. Pirúvico -0,363 0,0212	Estearoil carnitina 0,337 0,0335	Palmitoil carnitina 0,313 0,0489			
Susceptibilidade à fragmentação de DNA	Inosina -0,441 0,0071	Xantina 0,425 0,0098	Adenina -0,400 0,0105	Ác. Aspártico 0,355 0,0246	GSH -0,326 0,04	Adenosina -0,324 0,0417	Palmitoil carnitina -0,310 0,0413					
Defeitos maiores	Treonina 0,561 0,0002	Ác. Málico 0,548 0,0003	Metionina 0,523 0,0005	Alanina 0,511 0,0008	Creatina -0,438 0,0048	PC 18:0/14:0 0,431 0,0077	Leucina 0,427 0,006	Ác. Glutâmico 0,424 0,0063	Propionil carnitina -0,386 0,0139	GSH 0,378 0,0162	Ác. Succínico 0,340 0,0319	
Defeitos menores	Homo cisteína -0,571 0,0006	Glicina 0,463 0,0132	Glutamina -0,427 0,006	Creatina -0,424 0,0064	Adenina -0,383 0,0148	Ác. Succínico 0,354 0,0249	Acetil carnitina -0,339 0,0326					

ALH	Glutamina 0,510 0,0008	Acetil carnitina 0,464 0,0025	FMN -0,447 0,0103	GSH -0,436 0,0049	DMG 0,415 0,0078	PC 16:0/18:2 -0,393 0,0161	Homo cisteína 0,385 0,0295	Colina 0,342 0,0309	Ác. Adenil succínico 0,340 0,0316	Ác. Succínico -0,329 0,0381	Leucina -0,312 0,0498
BCF	Xantina 0,501 0,0019	FMN 0,378 0,0327	LPC 18:1 0,351 0,0261	Adenosina -0,347 0,0285	PC 16:0/18:2 0,323 0,0511	Adenina -0,320 0,0439	GMP 0,313 0,0495				
LIN	Glutamina -0,576 <,0001	Acetil carnitina -0,573 0,0001	Homo cisteína -0,518 0,0024	DMG -0,498 0,0011	FMN 0,497 0,0038	Colina -0,401 0,0104	Ác. Adenil succínico -0,396 0,0114	Ác. Lático -0,308 0,0195	Citrulina -0,368 0,0196	AMP cíclico -0,325 0,041	Ác. Succínico 0,318 0,0455

Fonte: Leite (2022)

Correlação com dados não transformados pelo teste de Spearman com ranqueamento. Correlações inversas são apresentadas em quadros vermelhos e correlações positivas azuis. A primeira linha abaixo do nome da variável é o valor de r e a segunda linha o valor de P.

Quadro 6 - Correlação variáveis funcionais e metabólicas, Angus de baixa fertilidade (n=40)

DAB Classe I	Ác. Cítrico 0,454 0,0032	Metionina 0,429 0,0058	Treonina 0,425 0,0063	PC 16:0/18:2 0,367 0,0197	Ác. Succínico -0,353 0,0257	Homo cisteína -0,329 0,0498						
DAB Classe II	SM d18:1/16:0 0,505 0,0009	Palmitoil carnitina 0,423 0,0066	Estearoil carnitina 0,411 0,0084	SM d18:1/18:0 0,369 0,0192	PC 16:1(9Z) 0,353 0,0295	Ác. Succínico 0,347 0,0282	Ác. Pantotênico -0,322 0,0426	Inosina 0,313 0,0495				
DAB Classe III	Ác. Málico -0,413 0,008	PC 16:0/18:2 -0,402 0,01	Ác. Cítrico -0,397 0,0113	Adenina -0,383 0,0148	Prolina -0,366 0,0203	Ác. α-ceto glutárico -0,353 0,0255	LPC 18:0 -0,320 0,0438	SM d18:1/24:1 -0,317 0,0466				
DAB Classe IV	GSSG -0,468 0,0023	Hipoxantina 0,421 0,0069	LPC 18:1 -0,403 0,01	Ác. Cítrico -0,402 0,0101	FMN -0,393 0,0176	Ác. Isocítrico -0,390 0,0128	PC 16:0/18:2 -0,356 0,0242	Ác. Glutâmico -0,333 0,036	AMP 0,319 0,045			
Índice de atividade mitocondrial	Ác. Cítrico 0,554 0,0002	PC 16:0/18:2 0,488 0,0014	Hipoxantina -0,457 0,003	Treonina 0,455 0,0032	Homo cisteína -0,394 0,0174	Metionina 0,378 0,0163	FMN 0,351 0,036	Ác. Succínico -0,334 0,0354	Ác. α-ceto glutárico 0,331 0,0368			
PMM Alto	Niacin amida 0,718 <,0001	Metionina 0,639 <,0001	Leucina 0,561 0,0002	Isoleucina 0,492 0,0013	L Carnitina 0,472 0,0021	LisoPAF 0,442 0,0043	Glicina -0,439 0,0119	Ác. Pirúvico -0,409 0,0088	Treonina 0,393 0,0122	Ác. Aspártico 0,366 0,0203	LPC 18:1 0,353 0,0254	
PMM Médio	Prolina 0,484 0,0015	FMN 0,467 0,0041	Ác. Cítrico 0,449 0,0036	Treonina 0,418 0,0072	Ác. α-ceto glutárico 0,407 0,0092	PC 16:0/18:2 0,390 0,0127	Homo cisteína -0,376 0,0236	AMP cíclico -0,368 0,0196	Metionina 0,343 0,0302	Adenosina 0,341 0,0314	Ác Málico 0,337 0,0335	
PMM Baixo	Metionina -0,648 <,0001	Niacin amida -0,593 <,0001	Treonina -0,543 0,0003	Isoleucina -0,472 0,0021	Ác. Cítrico -0,470 0,0022	Prolina -0,462 0,0027	Ác. Aspártico -0,459 0,0029	LPC 18:1 -0,448 0,0037	Ác. Málico -0,421 0,0069	L Carnitina -0,396 0,0113		
TBARS	Homo cisteína 0,715 <,0001	Hipoxantina -0,646 <,0001	Ác. Lático 0,594 <,0001	FMN 0,593 0,0002	Ác. Cítrico 0,592 <,0001	Ác. Isocítrico 0,559 0,0002	Adenina 0,509 0,0009	GSSG 0,479 0,002	Glutamina -0,469 0,0026	Citrulina -0,405 0,0105	AMP -0,400 0,0115	
EROs	Acetil carnitina 0,508 0,001	Ác. Aspártico 0,409 0,0097	Ác. Adenil succínico 0,392 0,0135	PC 16:0/18:2 -0,368 0,021								
Acrossoma íntegro	Ác. Cítrico 0,623 <,0001	Prolina 0,517 0,0006	Ác. Isocítrico 0,515 0,0007	Ác. Glutâmico 0,480 0,0017	Homo cisteína -0,480 0,0031	FMN 0,460 0,0048	Ác. Pantotênico 0,415 0,0077	GSSG 0,415 0,0078	Adenina 0,413 0,0081	AMP cíclico -0,396 0,0114		
Membrana Plasmática íntegra	Treonina 0,646 <,0001	Ác. Cítrico 0,616 <,0001	Prolina 0,523 0,0005	Homo cisteína -0,486 0,0026	Ác. Pantotênico 0,444 0,0041	Ác. Aspártico 0,435 0,005	Isoleucina 0,434 0,0052	PC 20:4/16:0 0,432 0,0054	Alanina 0,423 0,0081	Metionina 0,393 0,0114		

Susceabilidade à fragmentação de DNA	Ác. Cítrico 0,622 <,0001	Hipoxantina -0,552 0,0002	GSSG 0,502 0,001	Homo cisteína 0,481 0,003	Ác. Isocítrico 0,444 0,0041	FMN 0,435 0,008	Treonina 0,422 0,0067	Adenina 0,370 0,0189	Ác. Glutâmico 0,364 0,021	Ác. Aspártico 0,343 0,0301	AMP -0,316 0,0472
Defeitos maiores	Ác. Isocítrico 0,631 <,0001	Inosina 0,525 0,0005	GSSG 0,511 0,0007	Ác. Glutâmico 0,504 0,0009	PC 16:0/18:2 0,445 0,004	Ác. Láctico 0,434 0,0051	FMN 0,383 0,021	Adenina 0,365 0,0207	Hipoxantina -0,362 0,0216	Acetil carnitina 0,358 0,0232	LisoPAF 0,347 0,0283
Defeitos menores	AMP 0,50813 0,0008	DMG -0,44928 0,0036	Colina -0,40494 0,0095	Ác. Láctico -0,39349 0,012	Palmitoil carnitina -0,39092 0,0126	Guanosina -0,35639 0,024	SM d18:1/18:0 -0,34953 0,0271	Adenina -0,3316 0,0366	L Carnitina -0,32836 0,0386	Alanina -0,3192 0,0447	GSSG -0,31623 0,0468
ALH	Creatina 0,466 0,0024	Ác. γ-amino butírico 0,451 0,0035	Hipoxantina 0,371 0,0185	Ác. α-ceto glutárico 0,319 0,0447							
BCF	Creatina 0,592 <,0001	Alanina -0,484 0,0016	Hipoxantina 0,399 0,0107	Treonina -0,397 0,0112	Ác. Aspártico -0,383 0,0147	Isoleucina -0,369 0,0191	GSSG -0,360 0,0224	L Carnitina -0,360 0,0225	PC 16:0/18:2 -0,339 0,0324		
LIN	Ác. α-ceto glutárico -0,414 0,008	LPC 18:0 -0,383 0,0146	LisoPAF -0,382 0,015	PC 16:0/18:2 -0,363 0,0214	Prolina -0,340 0,0316	Adenosina -0,329 0,0385					

Fonte: Leite (2022)

Correlação com dados não transformados pelo teste de Spearman com ranqueamento. Correlações inversas são apresentadas em quadros vermelhos e correlações positivas azuis. A primeira linha abaixo do nome da variável é o valor de *r* e a segunda linha o valor de *P*.

Quadro 7 - Correlação variáveis funcionais e metabólicas, Nelore de alta fertilidade (*n*=44)

DAB Classe I	Acetil carnitina 0,566 <,0001	Ác. Láctico 0,486 0,0011	Ác. Glutâmico -0,436 0,0039	AMP cíclico -0,313 0,0435	Octanoil carnitina 0,310 0,046						
DAB Classe II	LPC 17:1(10Z) -0,494 0,0026	Acetil carnitina -0,366 0,017									
DAB Classe III	Colina -0,638 <,0001	Glutamina -0,471 0,0016	Ác. Láctico -0,437 0,0038	GSH 0,424 0,0051	Creatina -0,389 0,0109	Adenina -0,380 0,0129	L Carnitina -0,372 0,0153	DMG -0,370 0,0157	Acetil carnitina -0,366 0,017		
DAB Classe IV	Acetil carnitina -0,443 0,0033	Xantina 0,440 0,0058	Ác. Glutâmico 0,394 0,0099	Ác. Láctico -0,379 0,0133							
Índice de atividade mitocondrial	Acetil carnitina 0,553 0,0001	Ác. Láctico 0,537 0,0002	Ác. Glutâmico -0,430 0,0045	AMP cíclico -0,341 0,0273	Octanoil carnitina 0,323 0,0372	L Carnitina 0,322 0,0377					
PMM Alto	DHA 0,543 0,0001	SM d18:1/16:0 0,539 0,0002	GSH -0,415 0,0051	AMP -0,405 0,0063	Creatina 0,396 0,0077	Isoleucina 0,360 0,0163	Xantina 0,323 0,0417	Guanosina -0,311 0,04	AMP cíclico -0,310 0,0406	Ác. Aspártico 0,301 0,0473	Niacina amida 0,298 0,0493
PMM Médio	AMP cíclico -0,512 0,0004	Acetil carnitina 0,427 0,0038	GSH -0,391 0,0086	Guanosina -0,325 0,0316							
PMM Baixo	GSH 0,573 <,0001	AMP cíclico 0,514 0,0004	Creatina -0,430 0,0035	DHA -0,412 0,0055	Citrulina -0,405 0,0064	Isoleucina -0,372 0,0129	Xantina -0,371 0,0185	Guanosina 0,362 0,0157	Glutamina -0,354 0,0185	Treonina -0,342 0,023	Ác. Aspártico -0,328 0,03
TBARS	Ác. α-ceto glutárico -0,611 <,0001	PC 18:0/20:4 -0,555 <,0001	Ác. Isocítrico -0,520 0,0003	Ác. Pantotênico -0,515 0,0003	Xantina 0,490 0,0013	Ác. Láctico -0,430 0,0036	Ác. Pirúvico -0,425 0,0041	PC 16:1(9Z) -0,419 0,0071	Inosina -0,416 0,005	PC 16:0/18:2 -0,404 0,0066	LisoPAF -0,336 0,0257

EROs	FMN 0,445 0,004	Ác Lático 0,411 0,0056	GMP 0,368 0,0141	DHA -0,361 0,0161	Octanoil carnitina -0,354 0,0183	Ác. Pirúvico 0,328 0,0298	PC 20:4/16:0 -0,327 0,0321	Tirosina -0,318 0,0357	LisoPAF -0,299 0,0488			
Acrossoma íntegro	Octanoil carnitina 0,569 <.0001	GMP 0,484 0,0009	FMN 0,422 0,0066	Acetil carnitina 0,390 0,0088	AMP 0,362 0,0156	DHA -0,357 0,0173	Isoleucina -0,356 0,0178	Ác. Succínico -0,348 0,0206	Ác. Lático 0,336 0,0256	Ác. $\gamma$ -amino butírico 0,315 0,037		
Membrana plasmática íntegra	Ác. Isocítrico -0,352 0,0192	Acetil carnitina 0,352 0,0193	Ác. Pantotênico -0,319 0,0351	AMP cíclico -0,316 0,0368	Octanoil carnitina 0,314 0,0377	Ác. Succínico -0,309 0,0415	Ác. Glutâmico -0,307 0,0428					
Susceptibilidade à fragmentação de DNA	Colina -0,465 0,0015	DHA 0,461 0,0016	GMP -0,430 0,0036	Octanoil carnitina -0,426 0,004	Tirosina 0,421 0,0044	AMP -0,402 0,0068	TMP 0,393 0,0082	Acetil carnitina -0,392 0,0086	Ác. Pantotênico 0,370 0,0135	Isoleucina 0,369 0,0138	Ác. Glutâmico 0,368 0,014	
Defeitos maiores	Ác. Adenil succínico -0,547 0,0001	GSH -0,505 0,0005	Ác. $\gamma$ -amino butírico -0,468 0,0013	Acetil carnitina 0,460 0,0017	Citrulina 0,411 0,0056	SM d18:1/24:0 -0,385 0,0099	AMP cíclico -0,355 0,0181	Glicina 0,338 0,0246	Ác. Succínico 0,330 0,0287	FMN -0,314 0,0486	Ác. Lático 0,304 0,0446	
Defeitos menores	Ác. Isocítrico 0,507 0,0004	Glutamina 0,471 0,0013	PC 16:0/14:0 -0,453 0,002	Citrulina 0,394 0,0082	TMP 0,331 0,0284	LPC 17:1(10Z) 0,324 0,0503	Ác. Málico -0,299 0,0489					
ALH	Alanina -0,374 0,0125	Ác. Cítrico -0,362 0,0159	FMN 0,333 0,0359	Ác. Adenil succínico 0,328 0,0297								
BCF	LPC 17:1(10Z) -0,479 0,0027	Tirosina -0,434 0,0033	Ác. Succínico -0,398 0,0074	Isoleucina -0,384 0,01	AMP 0,360 0,0165	Ác. Aspártico -0,359 0,0166	Ác. Cítrico 0,353 0,0187	Valina -0,337 0,0251	Ác. Pantotênico -0,329 0,0291	DHA -0,326 0,0307		
LIN	Ác. Succínico -0,328 0,0297											

Fonte: Leite (2022)

Correlação com dados não transformados pelo teste de Spearman com ranqueamento. Correlações inversas são apresentadas em quadros vermelhos e correlações positivas azuis. A primeira linha abaixo do nome da variável é o valor de  $r$  e a segunda linha o valor de  $P$ .

Quadro 8 - correlação variáveis funcionais e metabólicas, Nelore de baixa fertilidade ( $n=28$ )

DAB Classe I	Ác. Adenil succínico -0,655 0,0002	Octanoil carnitina 0,630 0,0004	AMP 0,616 0,0006	Ác. Lático 0,613 0,0007	DMG 0,575 0,0017	Ác. Pirúvico 0,541 0,0036	Ác. Aspártico 0,533 0,0042	Adenina 0,523 0,0052	Colina 0,466 0,0144	Creatina 0,428 0,0258	Ác. Málico -0,383 0,0485
DAB Classe II	AMP -0,611 0,0007	Ác. Aspártico -0,581 0,0015	Ác. Adenil succínico 0,568 0,002	LPC 17:1(10Z) 0,552 0,0029	DMG -0,547 0,0031	Octanoil carnitina -0,535 0,004	Creatina -0,515 0,006	Colina -0,504 0,0074	Ác. Lático -0,495 0,0086	Ác. Pirúvico -0,484 0,0105	Citrulina -0,456 0,0168
DAB Classe III	AMP -0,616 0,0006	Octanoil carnitina -0,600 0,0009	Ác. Adenil succínico 0,563 0,0022	SM d18:1/18:0 -0,507 0,0069	Adenina -0,471 0,013	DMG -0,423 0,0281	Ác. Málico 0,416 0,0308	Adenosina -0,400 0,0389			
DAB Classe IV	SM d18:1/16:0 -0,569 0,002	Adenina -0,465 0,0146	Glutamina 0,416 0,0311	LisoPAF -0,406 0,0357	TMP 0,391 0,0437						
Índice de Atividade Mitochondrial (IAM)	Octanoil carnitina 0,600 0,0009	Ác. Lático 0,599 0,001	Adenina 0,575 0,0017	AMP 0,559 0,0024	Ác. Adenil succínico -0,549 0,003	Ác. Aspártico 0,517 0,0057	Ác. Pirúvico 0,458 0,0163	DMG 0,457 0,0165	Ác. Málico -0,443 0,0207	Adenosina 0,438 0,0222	
PMM Alto	Colina -0,750 <.0001	Ác. Lático -0,721 <.0001	Tirosina -0,696 <.0001	Ác. Pirúvico -0,650 0,0002	Citrulina -0,637 0,0003	Ác. Aspártico -0,624 0,0004	DMG -0,617 0,0005	Alanina -0,588 0,001	Isoleucina -0,567 0,0017	Valina -0,558 0,002	Creatina -0,497 0,0071



PMM Médio	Adenina 0,566 0,0017	Adenosina 0,504 0,0063	Ác. Láctico 0,495 0,0074	AMP 0,459 0,0141	PC 16:0/18:2 0,451 0,0159	Alanina 0,434 0,0209	Ác. Málico -0,434 0,021	DHA -0,432 0,0215	DMG 0,388 0,0414	Acetil carnitina 0,382 0,045	Citrulina 0,376 0,0489
PMM Baixo	Isoleucina 0,643 0,0002	Ác. Succínico 0,605 0,0007	Treonina 0,504 0,0063	Valina 0,499 0,0068	Colina 0,493 0,0077	Ác. Cítrico 0,488 0,0084	Tirosina 0,481 0,0096	GMP -0,441 0,0189	Guanosina 0,437 0,0201	Ác. Pirúvico 0,420 0,0261	Palmitoil carnitina 0,418 0,027
TBARS	Valina 0,711 <,0001	Ác. Láctico 0,666 0,0001	Tirosina 0,637 0,0003	Ác. Aspártico 0,605 0,0007	Leucina 0,579 0,0012	Ác. Glutâmico 0,573 0,0014	Ác. $\alpha$ -ceto glutárico 0,524 0,0042	LPC 18:1 -0,490 0,0081	Ác. Succínico 0,455 0,015	Adenina 0,433 0,0213	Ác. Málico -0,432 0,0217
EROs	Estearoil carnitina 0,541 0,0029	Ác. Cítrico 0,525 0,0041	Acetil carnitina 0,516 0,005	PC 18:0/20:4 -0,502 0,0065	Ác. Láctico 0,453 0,0154	Ác. Glutâmico 0,452 0,0157	Alanina 0,440 0,0191	Ác. Pirúvico 0,423 0,0249	Ác. Pantotênico 0,395 0,0377		
Acrossoma íntegro	LisoPAF 0,454 0,0174	PC 16:0/14:0 0,443 0,0207	Ác. Adenil succínico -0,429 0,0255								
Membrana plasmática íntegra	Ác. Isocítrico -0,592 0,0011	LisoPAF 0,519 0,0055	L Carnitina 0,519 0,0055	Ác. Adenil succínico -0,466 0,0143	TMP -0,418 0,0302						
Susceabilidade à fragmentação de DNA	Ác. Láctico -0,754 <,0001	Valina -0,664 0,0001	SM d18:1/16:0 -0,619 0,0004	LPC 18:1 -0,573 0,0014	Adenina -0,572 0,0015	Leucina -0,562 0,0018	Adenosina -0,516 0,005	Alanina -0,503 0,0064	Ác. Aspártico -0,500 0,0068	Estearoil carnitina -0,474 0,0108	PC 16:0/14:0 -0,471 0,0115
Defeitos maiores	Niacin amida 0,498 0,0069	Creatina -0,455 0,0149	GSSG 0,452 0,0159	Ác. Adenil succínico 0,443 0,0182	DHA -0,415 0,0283	Isoleucina -0,402 0,0339	Ác. Málico -0,392 0,0392				
Defeitos menores	Xantina 0,481 0,0173	Ác. Málico 0,468 0,0121	Adenosina -0,425 0,0243	Niacin amida -0,419 0,0265	Inosina 0,401 0,0343	SM d18:1/24:0 -0,388 0,0413	Creatina 0,384 0,0436				
ALH	Ác. Adenil succínico -0,630 0,0003	Octanoil carnitina 0,525 0,0041	DMG 0,490 0,0082	Ác. $\alpha$ -ceto glutárico -0,473 0,011	SM d18:1/16:1 -0,439 0,0193						
BCF	PC 16:0/14:0 0,511 0,0055	Ác. $\alpha$ -ceto glutárico 0,491 0,008	SM d18:1/16:1 0,483 0,0092	Octanoil carnitina -0,483 0,0093	FMN -0,459 0,0141						
LIN	Ác. Adenil succínico 0,573 0,0014	Octanoil carnitina -0,485 0,009	Ác. $\alpha$ -ceto glutárico 0,484 0,0091	SM d18:1/16:1 0,445 0,0178							

Fonte: Leite (2022)

Correlação com dados não transformados pelo teste de Spearman com ranqueamento. Correlações inversas são apresentadas em quadros vermelhos e correlações positivas azuis. A primeira linha abaixo do nome da variável é o valor de r e a segunda linha o valor de P.

## APÊNDICE 5 – QUADROS DE CORRELAÇÃO DO EXPERIMENTO 2.1

Os quadros abaixo são das análises de correlação realizadas entre os grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação nas amostras de células criopreservadas com dados das análises funcionais, apresentando apenas as variáveis com maior importância nas diferenças encontradas entre os grupos.

Quadro 9 - Correlação de variáveis funcionais no grupo com maior suscetibilidade à criopreservação ( $n=8$ )

DAB Classe III	IAM -0,741 0,0353	PMM médio 0,729 0,0402	SPTZ rápidos -0,721 0,0436				
DAB Classe IV	EROs 0,846 0,0082	SPTZ estáticos 0,796 0,0182	S. frag. DNA 0,713 0,0469	Defeitos maiores 0,698 0,0441			
Índice de Atividade mitocondrial (IAM)	DAB Classe I 0,886 0,0034	SPTZ rápidos 0,838 0,0093	VSL 0,762 0,028	Motil. total 0,743 0,0349	DAB Classe III -0,741 0,0353	VAP 0,714 0,0465	
PMM médio	PMM baixo -0,952 0,0003	PMM alto 0,905 0,002	DAB Classe III 0,729 0,0402				
Motilidade Total	SPTZ rápidos 0,916 0,0014	Motil. progress 0,910 0,0017	Across. íntegro 0,862 0,0059	IAM 0,743 0,0349			
Motilidade progressiva	Across. íntegro 0,934 0,0007	Motil. total 0,910 0,0017	VCL 0,886 0,0034	SPTZ rápidos 0,843 0,0085	SPTZ estáticos -0,699 0,0438	MP íntegra 0,683 0,0461	Defeitos maiores -0,639 0,0483
SPTZ estáticos	Defeitos maiores 0,957 0,0002	SPTZ rápidos -0,892 0,0029	Motil. total -0,825 0,0116	DAB Classe IV 0,796 0,0182	Motil. Progress -0,699 0,0438		
ALH	BCF -0,898 0,0024	TBARS 0,862 0,0059					
EROs	DAB Classe IV 0,846 0,0082	SPTZ lentos 0,788 0,0202	S. frag. DNA 0,707 0,0471				
TBARS	ALH 0,862 0,0059	BCF -0,857 0,0065	Across. íntegro -0,691 0,048				
Membrana Plasmática Íntegra (MP íntegra)	Defeitos maiores -0,766 0,0267						
Acrossoma íntegro	Motil. progress 0,934 0,0007	Motil. total 0,862 0,0059	Defeitos maiores -0,803 0,0164	VSL 0,690 0,048	TBARS -0,691 0,048		
Suscetibilidade à fragmentação de DNA (S. frag. DNA)	SPTZ lentos 0,873 0,0046	DAB Classe IV 0,713 0,0469	EROs 0,707 0,0471				

Fonte: Leite (2022)

Correlação com dados não transformados pelo teste de Spearman com ranqueamento. Correlações inversas são apresentadas em quadros vermelhos e correlações positivas azuis. A primeira linha abaixo do nome da variável é o valor de  $r$  e a segunda linha o valor de  $P$ .

Quadro 10 - Correlação de variáveis funcionais no grupo com menor suscetibilidade à criopreservação ( $n=8$ )

Índice de atividade mitocondrial (IAM)	VSL 0,905 0,002	DAB Classe I 0,838 0,0093	VAP 0,762 0,028	Defeitos maiores -0,754 0,0308	Across. íntegro 0,737 0,0366	SPTZ estáticos -0,747 0,0332	DAB Classe IV -0,679 0,0451	
PMM medio	PMM baixo -0,929 0,0009	DAB Classe III -0,826 0,0115	Motil. progress 0,762 0,028	BCF -0,755 0,0305	Motil. total 0,714 0,0465	PMM alto 0,714 0,0465		
PMM alto	Motil. Progress 0,952 0,0003	Across. íntegro 0,881 0,0039	Motil. total 0,852 0,0101	PMM baixo -0,833 0,0102	DAB Classe III -0,726 0,0415	PMM médio 0,714 0,0465		
Motilidade Total	Motil. Progress 0,929 0,0009	PMM alto 0,833 0,0102	TBARS -0,786 0,0208	BCF 0,778 0,0229	ALH 0,738 0,0366	Across. íntegro 0,738 0,0366		
Motilidade progressiva	Motil. total 0,929 0,0009	PMM alto 0,952 0,0003	Across. íntegro 0,929 0,0009	PMM baixo -0,833 0,0102	ALH -0,786 0,0208	PMM médio 0,762 0,028	TBARS -0,714 0,0465	
SPTZ rápidos	DAB Classe II -0,805 0,0159	EROs -0,790 0,0195						
STR	LIN 0,957 0,0002	S. frag. DNA -0,827 0,0113	DAB Classe II -0,730 0,0398					
LIN	STR 0,957 0,0002	DAB Classe II -0,755 0,0304	S. frag. DNA -0,671 0,0485					
EROs	SPTZ rápidos -0,790 0,0195							
TBARS	Motil. total -0,786 0,0208	Motil. progress -0,714 0,0465						
Membrana plasmática íntegra (MP íntegra)	VCL 0,905 0,002	VSL 0,833 0,0102	VAP 0,738 0,0366	Across. íntegro 0,738 0,0366	SPTZ estáticos -0,735 0,0378			
Acrossoma Íntegro (Across. Íntegro)	Motil. progress 0,929 0,0009	PMM alto 0,881 0,0039	VSL 0,810 0,0149	VCL 0,786 0,0208	SPTZ estáticos -0,771 0,0251	MP íntegra 0,738 0,0366	IAM 0,737 0,0366	Motil total 0,738 0,0366
Susceabilidade à fragmentação de DNA (S. frag. DNA)	ALH 0,854 0,007	Defeitos menores -0,830 0,0109	STR -0,827 0,0113	VCL 0,805 0,0159	VAP 0,708 0,0496	LIN -0,671 0,0485		

Fonte: Leite (2022)

Correlação com dados não transformados pelo teste de Spearman com ranqueamento. Correlações inversas são apresentadas em quadros vermelhos e correlações positivas azuis. A primeira linha abaixo do nome da variável é o valor de  $r$  e a segunda linha o valor de  $P$ .

## APÊNDICE 6 - LOADINGS DAS ANÁLISES DE PCA DO EXPERIMENTO 2.2

As tabelas abaixo apresentam *loadings* da PCA realizada pelo sistema em R do MetaboAnalyst 5.0 (XIA e WISHART, 2016; PANG, CHONG, *et al.*, 2021). As mesmas se referem aos dados das análises de metabólitos e são divididas em classes e entre as comparações realizadas entre os grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação nas diferentes amostras biológicas (plasma seminal, células espermáticas *in natura* e criopreservadas). *Loadings* positivos indicam que uma variável e um componente principal estão positivamente correlacionados: um aumento em um resulta em um aumento no outro. *Loadings* negativos indicam uma correlação inversa. *Loadings* maiores (positivos ou negativos) indicam que uma variável tem um forte efeito naquele componente principal. Nas legendas sob as tabelas de *loadings* de PCA são apresentadas as porcentagens de resposta de variância dos cinco componentes principais.

### Lipídios

Tabela 88 - *Loadings* de PCA dos dados de lipídios em plasma seminal nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

Lipídios (Plasma Seminal)	<i>Loadings</i> 1	<i>Loadings</i> 2
LPC(24:0)	0,535	-0,089
PC(19:0/19:0)	0,528	-0,219
Sph(d16:0)	0,412	-0,283
SM(d18:1/16:1)	0,335	-0,156
LPC(17:1(10Z)/0:0)	0,283	0,459
PC(18:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	0,187	0,590
SM(d18:1/24:0)	0,150	0,224
PC(16:0/18:2(9Z,12Z))	0,121	0,481

Fonte: Leite (2022)

Na tabela são apresentados os *loadings* dos componentes 1 e 2, com a variância dos componentes 1 a 5 equivalendo a 55,71%, 22,65%, 8,44%, 5,63% e 3,84%, respectivamente.

Tabela 89 - *Loadings* de PCA na análise dos dados de lipídios em células espermáticas de sêmen *in natura* nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

Lipídios ( <i>in natura</i> )	<i>Loadings</i> 1	<i>Loadings</i> 2
LPC(17:1(10Z)/0:0)	-0,533	-0,116
PC(18:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	0,365	0,025
DHA	0,358	-0,426
SM(d18:1/24:1(15Z))	0,329	0,273
PC(17:0/17:0)	0,297	-0,461
SM(d18:1/24:0)	0,297	0,157
PC(13:0/13:0)	0,264	0,551
Colesterol	0,261	0,052
Sph(d16:0)	-0,178	0,431

Fonte: Leite (2022)

Na tabela são apresentados os *loadings* dos componentes 1 e 2, com a variância dos componentes 1 a 5 equivalendo a 34,06%, 25,98%, 16,51%, 10,22% e 6,94%, respectivamente.

Tabela 90 - *Loadings* de PCA na análise dos dados de lipídios em células espermáticas de sêmen criopreservado nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

Lipídios (criopreservado)	<i>Loadings 1</i>	<i>Loadings 2</i>
PC(18:0/22:6)	0,421	-0,391
PC(20:4/16:0)	0,413	0,019
PC(16:0/18:2(9Z,12Z))	0,375	0,136
PC(18:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	0,372	-0,182
SM(d18:1/16:1)	0,363	0,225
PC(38:6)	0,334	-0,275
LPC(18:0)	0,238	0,292
Liso-PAF C-16	0,232	0,690
DHA	-0,141	0,329

Fonte: Leite (2022)

Na tabela são apresentados os *loadings* dos componentes 1 e 2, com a variância dos componentes 1 a 5 equivalendo a 81,12%, 7,17%, 4,57%, 2,07% e 1,88%, respectivamente.

## Carnitinas

Tabela 91 - *Loadings* de PCA dos dados de carnitinas em plasma seminal nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

Carnitinas (Plasma Seminal)	<i>Loadings 1</i>	<i>Loadings 2</i>
Lauroil-L-carnitina	0,527	-0,739
Tetradecanoilcarnitina	0,499	0,229
O-Decanoil-L-carnitina	0,372	0,072
Palmitoil-L-carnitina	0,360	0,528
Hexanoil-L-carnitina	0,294	0,028
Octanoil-L-carnitina	0,294	0,285
Estearoil-L-carnitina	0,182	-0,185

Fonte: Leite (2022)

Na tabela são apresentados os *loadings* dos componentes 1 e 2, com a variância dos componentes 1 a 5 equivalendo a 77,23%, 9,36%, 5,65%, 3,61% e 2,59%, respectivamente.

Tabela 92 - *Loadings* de PCA na análise dos dados de carnitinas em células espermáticas de sêmen *in natura* nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

Carnitinas ( <i>in natura</i> )	<i>Loadings 1</i>	<i>Loadings 2</i>
Lauroil-L-carnitina	0,628	0,0656
L-carnitina	0,529	0,201
Estearoil-L-carnitina	-0,413	0,592
Propionil-L-carnitina	0,274	0,052
Butiril-L-carnitina	-0,205	0,191
Acetilcarnitina	0,155	0,232
Octanoil-L-carnitina	0,120	0,715

Fonte: Leite (2022)

Na tabela são apresentados os *loadings* dos componentes 1 e 2, com a variância dos componentes 1 a 5 equivalendo a 43,28%, 24,92%, 15,13%, 10,01% e 3,01%, respectivamente.

Tabela 93 - *Loadings* de PCA na análise dos dados de carnitinas em células espermáticas de sêmen criopreservado nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

<b>Carnitinas (criopreservado)</b>	<b>Loadings 1</b>	<b>Loadings 2</b>
Estearoil-L-carnitina	0,559	-0,553
O-Decanoil-L-carnitina	0,400	0,392
Palmitoil-L-carnitina	0,393	-0,418
Tetradecanoilcarnitina	0,313	0,114
Octanoil-L-carnitina	0,308	0,410
Hexanoil-L-carnitina	0,283	0,215
Lauroil-L-carnitina	0,283	0,165
Propionil-L-carnitina	0,142	0,334

Fonte: Leite (2022)

Na tabela são apresentados os *loadings* dos componentes 1 e 2, com a variância dos componentes 1 a 5 equivalendo a 79,45%, 12,19%, 3,05%, 2,26% e 1,2%, respectivamente.

## Peptídeos, aminoácidos e derivados

Tabela 94 - *Loadings* de PCA dos dados de peptídeos, aminoácidos e derivados em plasma seminal nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

<b>Peptídeos, aminoácidos e derivados (Plasma Seminal)</b>	<b>Loadings 1</b>	<b>Loadings 2</b>
Acido aspártico	0,529	0,295
Dimetilglicina	-0,413	0,035
Glicina	0,397	0,377
Citrulina	-0,337	0,197
Acido glutâmico	0,322	-0,373
Hidroxiprolina	-0,295	0,142
Treonina	0,214	0,341
Glutaciona oxidada	0,166	-0,625
Glutamina	-0,124	0,256

Fonte: Leite (2022)

Na tabela são apresentados os *loadings* dos componentes 1 e 2, com a variância dos componentes 1 a 5 equivalendo a 52,17%, 21,1%, 11,35%, 6,55% e 4,82%, respectivamente.

Tabela 95 - *Loadings* de PCA na análise dos dados de peptídeos, aminoácidos e derivados em células espermáticas de sêmen *in natura* nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

<b>Peptídeos, aminoácidos e derivados (<i>in natura</i>)</b>	<b>Loadings 1</b>	<b>Loadings 2</b>
Glutaciona oxidada	-0,454	0,882
Leucina	0,382	0,129
Fenilalanina	0,379	0,191
Isoleucina	0,375	0,248
Acido aspártico	0,355	0,158
Metionina	0,350	0,268
Glutaciona	0,340	0,106

Fonte: Leite (2022)

Na tabela são apresentados os *loadings* dos componentes 1 e 2, com a variância dos componentes 1 a 5 equivalendo a 79,23%, 17,75%, 1,62%, 0,61% e 0,49%, respectivamente.

Tabela 96 - *Loadings* de PCA na análise dos dados de peptídeos, aminoácidos e derivados em células espermáticas de sêmen criopreservado nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

<b>Peptídeos, aminoácidos e derivados (criopreservado)</b>	<b>Loadings 1</b>	<b>Loadings 2</b>
Metionina	0,440	0,413
Citrulina	-0,396	0,218
Glutamina	0,315	0,152
Tirosina	-0,311	0,435
Leucina	-0,303	0,328
Hidroxiprolina	0,284	0,082
Dimetilglicina	-0,287	0,195
Acido glutâmico	0,282	0,415
Valina	0,261	0,341
Histidina	-0,227	0,358

Fonte: Leite (2022)

Na tabela são apresentados os *loadings* dos componentes 1 e 2, com a variância dos componentes 1 a 5 equivalendo a 66,30%, 17,73%, 5,01%, 3,82% e 2,70%, respectivamente.

## Ácidos orgânicos

Tabela 97 - *Loadings* de PCA dos dados de ácidos orgânicos em plasma seminal nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

<b>Ácidos orgânicos (Plasma Seminal)</b>	<b>Loadings 1</b>	<b>Loadings 2</b>
Ácido $\alpha$ -aminobutírico	0,539	-0,173
Ácido Cítrico	0,498	-0,044
Ácido Málico	-0,368	0,123
Ácido Isocítrico	0,349	0,075
Ácido Succínico	-0,335	0,330
Ácido Láctico	-0,309	0,096
Ácido Adenilsuccínico	0,281	0,910

Fonte: Leite (2022)

Na tabela são apresentados os *loadings* dos componentes 1 e 2, com a variância dos componentes 1 a 5 equivalendo a 77,31%, 12,29%, 5,48%, 2,69% e 1,21%, respectivamente.

Tabela 98 - *Loadings* de PCA na análise dos dados de ácidos orgânicos em células espermáticas de sêmen *in natura* nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

<b>Ácidos orgânicos (<i>in natura</i>)</b>	<b>Loadings 1</b>	<b>Loadings 2</b>
Ácido Isocítrico	0,558	-0,145
Ácido Málico	0,463	0,059
Ácido Cítrico	0,415	0,286
Acido Pantotênico	0,380	0,499
Ácido $\alpha$ -aminobutírico	0,252	-0,102
Ácido Pirúvico	-0,212	0,655
Ácido Adenilsuccínico	-0,187	0,246
Ácido Succínico	0,115	-0,380

Fonte: Leite (2022)

Na tabela são apresentados os *loadings* dos componentes 1 e 2, com a variância dos componentes 1 a 5 equivalendo a 87,36%, 6,71%, 2,70%, 1,09% e 1,04%, respectivamente.

Tabela 99 - *Loadings* de PCA na análise dos dados de ácidos orgânicos em células espermáticas de sêmen criopreservado nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

Ácidos orgânicos (criopreservado)	<i>Loadings</i> 1	<i>Loadings</i> 2
Ácido Cítrico	-0,514	0,482
Ácido $\alpha$ -cetoglutárico	0,461	0,179
Ácido Isocítrico	0,395	0,519
Ácido Pirúvico	0,359	-0,444
Ácido $\gamma$ -aminobutírico	-0,325	0,158
Acido Pantotênico	0,291	0,284
Ácido Málico	0,219	0,405

Fonte: Leite (2022)

Na tabela são apresentados os *loadings* dos componentes 1 e 2, com a variância dos componentes 1 a 5 equivalendo a 70,50%, 13,61%, 6,63%, 4,81% e 2,71%, respectivamente.

### Nucleobases, nucleosídeos, nucleotídeos e demais metabólitos

Tabela 100 - *Loadings* de PCA dos dados de demais metabólitos em plasma seminal nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

Demais metabólitos (Plasma Seminal)	<i>Loadings</i> 1	<i>Loadings</i> 2
Mononucleotídeo de Flavina	0,505	0,088
Monofosfato de Guanosina	0,452	0,232
Ácido Úrico	-0,438	0,554
FAD	0,340	-0,121
Inosina	0,261	0,608
Xantina	-0,246	0,303
Alantoína	0,232	0,365
Hipoxantina	0,225	-0,150

Fonte: Leite (2022)

Na tabela são apresentados os *loadings* dos componentes 1 e 2, com a variância dos componentes 1 a 5 equivalendo a 54,25%, 18,42%, 14,01%, 5,15% e 3,55%, respectivamente.

Tabela 101 - *Loadings* de PCA na análise dos dados de demais metabólitos em células espermáticas de sêmen *in natura* nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

Demais metabólitos ( <i>in natura</i> )	<i>Loadings</i> 1	<i>Loadings</i> 2
FAD	-0,512	0,257
Nicotinamida	0,479	-0,316
Monofosfato de Guanosina	0,412	0,780
Hipoxantina	0,396	-0,157
Monofosfato de Adenosina	0,350	0,096
AMP cíclico	0,208	0,201
Colina	0,181	-0,289
Xantina	0,163	0,261

Fonte: Leite (2022)

Na tabela são apresentados os *loadings* dos componentes 1 e 2, com a variância dos componentes 1 a 5 equivalendo a 84,64%, 8,98%, 2,69%, 1,8% e 0,85%, respectivamente.



Tabela 102 - *Loadings* de PCA na análise dos dados nucleobases, nucleosídeos, nucleotídeos e demais metabólitos em células espermáticas de sêmen criopreservado nos grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação

<b>Demais metabólitos (criopreservado)</b>	<b><i>Loadings</i> 1</b>	<b><i>Loadings</i> 2</b>
Monofosfato de Adenosina	0,788	0,238
Inosina	-0,333	-0,017
Monofosfato de Guanosina	0,251	-0,249
Xantina	0,237	0,169
FAD	0,234	0,265
Guanosina	-0,222	0,374
AMP cíclico	-0,162	0,270
Monofosfato de citidina	-0,140	0,755

Fonte: Leite (2022)

Na tabela são apresentados os *loadings* dos componentes 1 e 2, com a variância dos componentes 1 a 5 equivalendo a 76,92%, 11,57%, 4,68%, 3,24% e 1,6%, respectivamente.

## **APÊNDICE 7 – QUADROS DE CORRELAÇÃO CAPÍTULO 2**

Os quadros abaixo são das análises de correlação realizadas entre os grupos com maior e menor suscetibilidade à criopreservação nas amostras de células criopreservadas com os dados das análises funcionais e metabólicas. Foram utilizadas apenas as variáveis que apresentaram maior importância nas diferenças encontradas entre os grupos.

Quadro 11 - Correlação de variáveis funcionais e metabólicas no grupo com maior suscetibilidade à criopreservação ( $n=8$ )

DAB Classe II	Triptofano 0,663 0,04733					
DAB Classe III	PC (18:0/22:6) 0,766 0,0267	Ác. $\alpha$ -ceto glutárico -0,753 0,049				
PMM baixo	LPC (16:0/0:0) 0,857 0,0065	SM (d18:1/24:0) 0,816 0,0084	Metionina 0,837 0,0102	GSSG 0,842 0,0138	Ác. $\alpha$ -ceto glutárico -0,786 0,0362	
PMM médio	LPC (16:0) -0,837 0,0072	Metionina -0,786 0,0208	Inosina -0,762 0,028	Ác. $\alpha$ -ceto glutárico 0,750 0,0322	GSSG -0,718 0,0342	
PMM alto	Inosina -0,905 0,002	Metionina -0,857 0,0058	LPC (16:0/0:0) -0,863 0,0087	GSSG -0,813 0,0138	SM (d18:1/24:0) -0,645 0,0124	
Motilidade Total	Nicotinamida -0,814 0,0138					
Motilidade progressiva	Nicotinamida -0,970 <,0001	SM (d18:1/24:0) -0,762 0,028	Palmitoil L-carnitina 0,714 0,0335	LPC(18:1) -0,719 0,0446		
SPTZ estáticos	Propionil L-carnitina -0,910 0,0017	Sph(d16:0) 0,784 0,026				
ALH	PC (18:0/22:6) 0,755 0,0221	FAD 0,73055 0,0396				
LIN	PC (18:0/22:6) -0,843 0,0085	Ác. $\alpha$ -ceto glutárico 0,818 0,0244	Estearoil L-carnitina -0,711 0,0481			
Defeitos maiores	Colesterol 0,699 0,0438					
EROs	Tirosina -0,807 0,0159	Triptofano -0,711 0,0451	Citrulina -0,703 0,0446			
TBARS	Glutamina -0,738 0,0367	FAD 0,714 0,0465				
Membrana plasmática Íntegra (MP íntegra)	Alanina -0,857 0,0065	Nicotinamida -0,786 0,0208	LPC(18:1) -0,762 0,028	SM (d18:1/24:0) -0,738 0,0366		
Acrossoma Íntegro (Across. íntegro)	Nicotinamida -0,881 0,0039	SM (d18:1/24:0) -0,786 0,0208				
Susceabilidade à fragmentação de DNA (S. frag. DNA)	Valina -0,790 0,0195	Metionina -0,719 0,0321				

Fonte: Leite (2022)

Correlação com dados não transformados pelo teste de Spearman com ranqueamento. Correlações inversas são apresentadas em quadros vermelhos e correlações positivas azuis. A primeira linha abaixo do nome da variável é o valor de  $r$  e a segunda linha o valor de  $P$ .

Quadro 12 - Correlação de variáveis funcionais e metabólicas no grupo com menor suscetibilidade à criopreservação ( $n=8$ )

DAB Classe I	Ác. cítrico 0,922 0,0011	Glutamina 0,874 0,0045	L-carnitina -0,766 0,0265	
DAB Classe II	Ác. cítrico 0,837 0,0096			
DAB Classe III	SM (d18:1/16:1) -0,826 0,0115			
Índice de Atividade Mitocondrial (IAM)	Glutamina 0,810 0,0149	Creatina -0,762 0,028		
PMM médio	Propionil L-carnitina 0,801 0,0135	PC(38:6) -0,810 0,0149	Estearoil L-carnitina 0,733 0,019	SM d18:1/16:1 -0,762 0,028
PMM alto	DHA -0,905 0,002	PC (16:1(9Z)) -0,732 0,039	Propionil L-carnitina 0,714 0,0465	
Motilidade Total	DHA 0,738 0,0366	Ác. láctico 0,748 0,0377		
Motilidade progressiva	DHA 0,905 0,002	AMP 0,833 0,0102		
SPTZ estáticos	Ác. láctico -0,916 0,0014	Ác. isocítrico -0,855 0,0068	Glutamina -0,831 0,0105	
ALH	SM (d18:1/24:0) -0,834 0,0103	Palmitoil L-carnitina -0,786 0,0208	GSH -0,762 0,028	PC(38:6) -0,714 0,0465
LIN	AMPc -0,810 0,0149	FAD 0,762 0,028	Xantina 0,717 0,0455	
EROs	DHA -0,690 0,048			
TBARS	Ác. isocítrico -0,811 0,0169			
Membrana plasmática íntegra (MP íntegra)	Fenilalanina 0,834 0,011	Glutamina 0,714 0,0427		
Acrossoma íntegro (Across. Íntegro)	DHA 0,952 0,0003	AMP 0,738 0,0366	Ác. láctico 0,704 0,0431	
Susceptibilidade à fragmentação de DNA (S. frag. DNA)	GSH -0,781 0,0222	PC (16:1(9Z)) -0,732 0,039		

Fonte: Leite (2022)

Correlação com dados não transformados pelo teste de Spearman com ranqueamento. Correlações inversas são apresentadas em quadros vermelhos e correlações positivas azuis. A primeira linha abaixo do nome da variável é o valor de  $r$  e a segunda linha o valor de  $P$ .

## **ANEXOS**

## ANEXO 1 – Artigo publicado

A imagem abaixo é referente à publicação do artigo do Capítulo 1, Experimento 1, na Animal Reproduction Science - <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.106922>



### Sperm function and oxidative status: Effect on fertility in *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls when semen is used for fixed-time artificial insemination

Roberta Ferreira Leite<sup>a</sup>, João Diego de Agostini Losano<sup>a,b</sup>,  
Giulia Kiyomi Vechiato Kawai<sup>a</sup>, Bruno Rogério Rui<sup>a</sup>, Ken Kawaoka Nagai<sup>a</sup>,  
Vivian Cardoso Castiglioni<sup>a</sup>, Adriano Felipe Perez Siqueira<sup>a</sup>, Mayra Elena  
Ortiz D'Avila Assumpção<sup>a</sup>, Pietro Sampaio Baruselli<sup>a</sup>, Marcilio Nichi<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, n. 87, Cidade Universitária, São Paulo, SP CEP 05508-270, Brasil

<sup>b</sup> Department of Animal Sciences, University of Florida, 2250 Shealy Dr, Gainesville, Florida 32608

#### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Functional analysis  
Oxidative status  
Reproductive biotechniques  
Artificial insemination

#### ABSTRACT

Semen quality is one of the criteria used for the selection of bulls with relatively greater fertility. In addition, bull fertility depends on the integrity and function of all sperm structures. The aim of this study, therefore, was to determine associations when there was conducting of conventional and functional techniques for the evaluation of sperm samples from bulls with known fertility history as determined when semen from these bulls was used for fixed-time artificial insemination programs. The study was designed in a 2 × 2 factorial arrangement, with one factor being breed (Angus x Nelore) and the other fertility (greater x lesser). Greater fertility groups were composed of ten Angus and 11 Nelore bulls, while lesser fertility groups were composed of ten Angus and seven Nelore bulls. Sperm were analyzed, in four cryopreserved distinct batches for each animal, for morphology, kinetics, plasma and acrosomal membrane integrity, mitochondrial activity and mitochondrial membrane potential, DNA integrity and oxidative status. There was no difference in characteristics commonly used in sperm quality conventional analysis. The results from functional analysis indicated an important association between mitochondrial dysfunctions, oxidative stress, and damage to sperm structures in lesser fertility bulls. Greater fertility bulls had greater sperm quality and indicators of functional cell structures. The associations, when there were evaluations using different techniques, indicate the importance of evaluation and correlation between different sperm functions to understand effects of distinct parameters on sperm fertilization capacity.

## ANEXO 2 – Parceria com a IonMedicine

A imagem abaixo é referente à parceria estabelecida com a empresa IonMedicine para as análises metabolômicas target realizadas nos Capítulos 1 e 2, Experimento 2



### CARTA DE CRÉDITO PARA UTILIZAÇÃO INTERNA EM PROJETO DE PESQUISA

São Paulo, 09 de março de 2021.

Ilmo. Prof. Dr. Marcilio Nichi,

Usando das prerrogativas regulamentares estipuladas internamente pelo conselho administrativo da IonMedicine, lhe é concedido créditos no valor de R\$230.000,00 a serem utilizados estritamente para análises metabolômicas target a serem realizadas nesta empresa, de 105 metabolitos, de 200 amostras, em 4 métodos de análises metabolômicas para o projeto de pesquisa intitulado "Análise lipidômica, metabolômica e dos atributos espermáticos de touros com diferentes taxas de fertilidade e perfis de congelamento de sêmen." submetido e aprovado pelo comitê científico da IonMedicine. Seus créditos são intransferíveis e devem ser utilizados no prazo de vigência do projeto.

Prof. Dr Edson Guimarães Lo Turco  
Diretor Científico IonMedicine – Clinical Metabolomics